

GENEXPRESSIONS-VERÄNDERUNGEN ZU FRÜHEN ZEITPUNKTEN DER HYPOXIE IN DER MAUSLUNGE MIT BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DES VASKULÄREN KOMPARTIMENTS

JOHANNES BARDO BEST

INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition wissenschaft
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Genexpressions-Veränderungen zu frühen Zeitpunkten
der Hypoxie in der Mauslunge mit besonderer
Berücksichtigung des vaskulären Kompartiments**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Johannes Bardo Best

aus Frankfurt am Main

Gießen 2009

Aus dem Institut für Pathologie
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen
kommissarischer Leiter: Prof. Dr. R. Moll

Gutachter: Prof. Dr. L. Fink
Gutachter: Prof. Dr. N. Weißmann

Tag der Disputation: 27.01.2010

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	XI
Anmerkung zur Schreibweise.....	XII
1 Einleitung	1
1.1 Bedeutung von Sauerstoff für den Organismus	1
1.2 Hypoxie in der Lunge	2
1.3 Hypoxie-assoziierte Erkrankungen der Lunge und Beeinflussung anderer Organsysteme	4
1.4 Hypoxie im Mausmodell	6
1.5 DNA-Microarray-Technologie.....	6
2 Ziele der Arbeit.....	8
3 Material und Methoden.....	9
3.1 Material	9
3.1.1 Tiere	9
3.1.2 Kleinmaterial.....	9
3.1.3 Geräte	9
3.1.4 Reagenzien und Puffer.....	10
3.1.5 Software	12
3.1.6 Datenbanken	13
3.2 Methoden	14
3.2.1 Haltung der Mäuse und Präparation der Lungen	14

3.2.2	Extraktion von Gesamt-RNA aus Lungenhomogenat	15
3.2.2.1	Zelllyse und Extraktion der Gesamt-RNA.....	15
3.2.2.2	Säulenaufreinigung der Gesamt-RNA	15
3.2.3	Quantitative und qualitative Beurteilung der Gesamt-RNA	16
3.2.3.1	UV-Absorptionsspektrophotometrie.....	16
3.2.3.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	17
3.2.3.3	Kapillarelektrophorese.....	18
3.2.4	cDNA-Synthese mit gleichzeitiger Fluoreszenz- Markierung	19
3.2.5	cRNA-Synthese und T7-Amplifikation mit gleichzeitiger Fluoreszenzmarkierung.....	20
3.2.5.1	Säulenaufreinigung der markierten cDNA	20
3.2.5.2	Quantitative und qualitative Beurteilung der markierten cDNA	21
3.2.6	Microarray-Experimente	22
3.2.6.1	Hybridisieren, Waschen und Trocknen der Microarrays.....	23
3.2.6.1.1	Vorgehensweise bei MWG-Microarrays	23
3.2.6.1.2	Vorgehensweise bei Agilent-Microarrays.....	23
3.2.6.2	Scannen der Microarrays	24
3.2.6.3	Bildanalyse und Gewinnung der Daten	24
3.2.6.4	Datenanalyse.....	25
3.2.6.4.1	Erste Gütekriterien der Arrays und Spots	25
3.2.6.4.2	Berechnung der Zielgrößen	26
3.2.6.4.3	Statistische Auswertung	27
3.2.6.4.4	Analyse der Kandidaten-Gene.....	28
3.2.7	Quantitative real-time-PCR	29
3.2.7.1	Reverse Transkription (RT-Reaktion).....	29
3.2.7.2	Real-time-PCR mit SYBR Green I.....	30
3.2.7.3	Relative Quantifizierung	30
3.2.7.4	Schmelzkurvenanalyse und Agarose-Gelelektrophorese.....	33

3.2.7.5	Design der Primerpaare	34
3.2.7.6	Validierung der Primerpaare.....	35
3.2.8	Immunhistochemie von Mauslungengewebe	35
4	Ergebnisse	37
4.1	Microarray-Experiment.....	37
4.1.1	Qualitative Beurteilung der einzelnen Hybridisierungen.....	37
4.1.2	Ergebnisse des Microarray-Experiments	39
4.1.2.1	Anzahl der selektierten Kandidaten-Gene.....	42
4.1.2.2	Vergleich der differentiellen Expressionsprofile nach 3h bzw. 24h Hypoxie	44
4.1.2.3	Überprüfung ausgewählter Kandidaten-Gene auf <i>Hypoxia Responsive Elements</i> (HRE)	47
4.1.2.4	Einfluss der Kandidaten-Gene auf zelluläre Signalwege.....	51
4.1.2.5	Molekulare Funktion der Kandidaten-Gene.....	53
4.2	Vergleich der Agilent-Microarray-Daten mit denen von MWG-Microarrays ..	55
4.3	Bestätigung der Ergebnisse durch real-time-PCR	56
4.4	Lokalisation der Proteine ausgewählter Kandidaten-Gene	59
5	Diskussion	61
5.1	Methoden-basierte Diskussion	61
5.1.1	Das Microarray-Experiment.....	61
5.1.2	Aussagewert von Microarray-Daten aus Lungenhomogenat	63
5.2	Hypoxie-assoziierte Transkriptionsfaktoren	66
5.3	Beurteilung der Expressionsmuster	68
5.3.1	Expressionsmuster auf molekularer Ebene.....	69
5.3.2	Expressionsmuster im Kontext zellulärer Signalwege.....	70
5.3.2.1	Expressionsmuster im Kontext des Gefäßsystems der Lunge.....	70
5.3.2.2	MAP-Kinase-Signalwege und Zellzyklus.....	74

5.3.2.3	Veränderungen von Seiten des Immunsystems.....	75
5.4	Bedeutung der Ergebnisse in Bezug auf Therapieansätze bei pulmonaler Hypertonie	77
5.5	<i>Bcar3</i> und seine Bedeutung für die Hypoxie-induzierten Veränderungen in der Lunge.....	79
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	81
7	Abstract	82
8	Literaturverzeichnis.....	83
9	Verzeichnis wissenschaftlicher Publikationen	91
10	Anhang	92
11	Erklärung.....	93
12	Danksagung	94

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
<i>Bcar3</i>	breast cancer anti estrogen resistance 3
bit	Maßeinheit für Datenmengen in der Informatik
<i>Bnip3</i>	bcl-2/adenovirus-E1B-19kD-interacting-protein
bp	Basenpaar(e)
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary-DNA</i>)
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure (<i>complementary-RNA</i>)
CT	Schwellen-Zyklus (<i>Threshold Cycle</i>)
Da	Dalton
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
dNTP	Desoxyribose-Nukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
DG	Deutsche Gesellschaft
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
<i>Dscr1</i>	down syndrome chromosome region 1
dsDNA	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
ε	Effizienz
<i>End1</i>	endothelin 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>Egr1</i>	early growth response 1
<i>Erk</i>	extracellular signal-regulated kinase (mitogen activated protein kinase 1 and 3)

<i>et al.</i>	und andere
f	<i>fold-change</i> = Faktor der differentiellen Expression
<i>F3</i>	thromboplastin
<i>F2r</i>	thrombin 2 receptor
FADH	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FiO ₂	inspiratorische Sauerstoff-Konzentration
<i>Fst</i>	follistatin
g	Gramm oder Beschleunigung (1g = 9.81m/s ²)
G	Gauge (Maßeinheit)
GO	<i>gene ontology</i>
h	Stunde(n) (<i>hour</i>)
HBS	HIF-Bindungsstellen (<i>HIF-binding-sites</i>)
HCL	Chlorwasserstoff
Hif	hypoxia-inducible factor
Hox	Hypoxie
HPV	hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
HRE	<i>hypoxia responsive element</i>
<i>Ier</i>	immediate early response
<i>Ilgf6</i>	insulin-like growth factor 6
<i>Jnk</i>	c-Jun N-terminal kinase (mitogen activated protein kinase 8 - 10)
k	Kilo
Kap.	Kapitel
Kg	Körpergewicht
l	Liter
m	Meter oder milli
M	molare Masse
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesium-Chlorid
min	Minute(n)
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger-RNA</i>)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
<i>Nfil6</i>	nuclear factor interleukin 6
n	Nano
Nox	Normoxie

n.s.	nicht signifikant
O ₂	Sauerstoff
OD	Extinktion (optische Dichte)
o.g.	oben genannt
OSA	obstruktive Schlafapnoe
<i>p38</i>	mitogen activated protein kinase 14
PAP	pulmonal-arterieller Druck
<i>Pbgd</i>	porphobilinogen deaminase
PCO ₂	Kohlendioxid-Partialdruck
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
<i>Pdgf (b)</i>	platelet derived growth factor (beta)
pH	pH-Wert
PH	pulmonale Hypertonie
<i>Plat</i>	plasminogen activator
PO ₂	Sauerstoff-Partialdruck
<i>Retnla</i>	resistin like alpha
RFU	<i>relative fluorescence units</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rRNA	<i>ribosomale ribonucleic acid</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	reverse Transkription
s	Sekunde(n) oder siehe
<i>Serpine1</i>	plasminogen activator inhibitor
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Laurylsulfat)
s.o.	siehe oben
<i>(c)-src</i>	tyrosine protein kinase c
SSC	<i>sodiumcitrate</i>
ssDNA	Einzelstrang-Desoxyribonukleinsäure
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	Tris <i>buffered saline</i>
TE	Tris-EDTA
<i>Tgfb1</i>	transforming growth factor beta 1

<i>Thbs1</i>	thrombospondin 1
<i>Tnc</i>	tenascin C
<i>Trf</i>	transferrin
U	Einheit(en) (<i>unit</i>)
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolet
V	Volt
<i>Vegf (c)</i>	vascular endothelial growth factor (c)
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
μ	Mikro

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1	Spektrophotometrische Messung der Gesamt-RNA.....	17
Abb. 3.2	Agarose Gelelektrophorese von Gesamt-RNA	18
Abb. 3.3	Qualitative Beurteilung der Gesamt-RNA	19
Abb. 3.4	Absorptionsspektrum von Cy-markierter cDNA	21
Abb. 3.5	Design eines <i>dye-swap</i> -Experiments am Beispiel eines normoxischen und hypoxischen Pools.....	22
Abb. 3.6	Vorder- und Hintergrundberechnung der Spots.....	25
Abb. 3.7	Wichtungsfunktionen zur qualitativen Beurteilung der Spots.....	26
Abb. 3.8	Typischer Kurvenverlauf einer quantitativen PCR mit norm- oxischen und hypoxischen Proben am Beispiel von <i>Fst</i>	31
Abb. 4.1	Beispiel unterschiedlicher Genexpressionen im Lungen- homogenat (nach 24h Hypoxie).....	37
Abb. 4.2	Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Microarrays.....	38
Abb. 4.3	MA-Plots vor Normalisierung	39
Abb. 4.4	MA-Plots nach Normalisierung	40
Abb. 4.5	Boxplot-Darstellung der M-Werte aller Microarrays	41
Abb. 4.6	MA-Plot des <i>fit</i> der 3h- und 24h-Hypoxie- Experimente nach Normalisierung.....	41
Abb. 4.7	Vulcano Plot der B-Statistik für beide 3h und 24h Hypoxie	42
Abb. 4.8	Kandidaten-Gene nach 3h bzw. 24h Hypoxie: Anzahl und Schnittmenge	43
Abb. 4.9	Kandidaten-Gene nach 3h und 24h Hypoxie: Regulationsrichtung .	43
Abb. 4.10	Vergleich der nach 3h als reguliert gefundenen Kandidaten-Gene mit denen nach 24h	47
Abb. 4.11	Auswahl reguliert gefundener Kandidaten-Gene mit den jeweiligen <i>Hypoxia Responsive Elements</i> in der 3h-Hypoxie-Gruppe	49

Abb. 4.12	Auswahl reguliert gefundener Kandidaten-Gene mit den jeweiligen <i>Hypoxia Responsive Elements</i> in der 24h-Hypoxie-Gruppe.....	50
Abb. 4.13	Verteilung der hoch- und herabregulierten Kandidaten-Gene hinsichtlich ihrer Funktion	54
Abb. 4.14	Vergleich der Agilent- mit den MWG-Microarrays, bezogen auf die M-Werte	56
Abb. 4.15	Nachweis der Produktspezifität der Primer mittels Gelelektrophorese	57
Abb. 4.16	Vergleich der $\Delta\Delta C_T$ -Werte aus der real-time-PCR mit den M-Werten der Microarray-Experimente der 3h-Hypoxie-Gruppe an ausgewählten Genen	58
Abb. 4.17	Vergleich der $\Delta\Delta C_T$ -Werte mit den M-Werten des Microarray-Experiments der 24h-Hypoxie-Gruppe an ausgewählten Genen	58
Abb. 4.18	Immunhistochemische Darstellung von Bcar3 in der Mauslunge	60
Abb. 4.19	Immunhistochemische Darstellung von Retn1a in der Mauslunge ...	60
Abb. 4.20	Negativkontrollen der immunhistochemischen Untersuchungen	60
Abb. 10.1	Fluoreszenzintensitäten von Microarrays einer defekten Charge	92

Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1	Primer Sequenzen	34
Tab. 3.2	Zum immunhistochemischen Protein-Nachweis verwendete Antikörper.....	36
Tab. 4.1	Relative Genexpression der 50 am stärksten hochregulierten Kandidaten-Gene nach 3h Hypoxie	44
Tab. 4.2	Relative Genexpression der 50 am stärksten hochregulierten Kandidaten-Gene nach 24h Hypoxie	45
Tab. 4.3	Relative Genexpression der 20 am stärksten herabregulierten Kandidaten-Gene nach 3h Hypoxie	46
Tab. 4.4	Relative Genexpression der 20 am stärksten herabregulierten Kandidaten-Gene nach 24h Hypoxie	46
Tab. 4.5	Bekannte Zielgene von HIF1 (modifiziert nach Ke <i>et al.</i> und Semenza) ^[36,77]	48
Tab. 4.6	Durch 3h Hypoxie beeinflusste KEGG-Signalwege	51
Tab. 4.7	Durch 24h Hypoxie beeinflusste KEGG-Signalwege	52
Tab. 4.8	Relative Genexpression der am stärksten hochregulierten Kandidaten-Gene nach 24h Hypoxie der Agilent-Microarrays.....	55
Tab. 4.9	Effizienz (ϵ) der verwendeten Primer für die real-time-PCR	57
Tab. 5.1	Biologische Funktionen HIF-regulierter Gene (modifiziert nach Ke <i>et al.</i>) ^[36]	68

Anmerkung zur Schreibweise

Gene werden in kursiver Schrift angegeben, Proteine in normaler Schrift. Bei nicht-humanen Genen und Proteinen ist nur der erste Buchstabe als Großbuchstabe gesetzt; humane Gene und Proteine sind durchgängig mit Großbuchstaben bezeichnet. Ausgeschriebene Gen- und/oder Proteinennamen werden immer klein und in normaler Schrift angegeben.

Bei Zahlen wird der Punkt als Dezimaltrennzeichen benutzt.

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von Sauerstoff für den Organismus

Sauerstoff wird im aeroben Stoffwechsel bei der Herstellung des ubiquitär benötigten Energieträgers ATP gebraucht. Aus Nährstoffen, wie z.B. Kohlenhydraten oder Fettsäuren, werden im Zitratzyklus durch Oxidation zunächst NADH und FADH₂ gebildet, welche dann an der inneren mitochondrialen Membran mit molekularem Sauerstoff zur Reaktion gebracht werden (so genannte Innere Atmung). Dies liefert die Energie, welche für die oxidative Phosphorylierung des ADP zum energiereicheren ATP nötig ist^[3].

Ein komplexer Organismus, welcher aus Milliarden Zellen besteht, muss zahlreiche Mechanismen aufweisen, um die O₂-Aufnahme der Zellen sowie den O₂-Transport zwischen den einzelnen Kompartimenten zu koordinieren und zu messen. Um hypoxische, aber auch hyperoxische Zustände zu vermeiden, die beide schwerwiegende Gewebeschäden zur Folge haben können, müssen Angebot und Bedarf an Sauerstoff ständig aufeinander abgestimmt werden^[1,38,64]. Dazu zählt das Messen des arteriellen O₂- und CO₂-Partialdrucks (PO₂ und PCO₂) mittels der Chemorezeptoren im Sinus caroticus und aoticus, welche die zentrale Kreislaufregulation wie Atmung und Blutdruck über die Medulla oblongata beeinflussen und so die systemische Sauerstoffversorgung binnen Sekunden regulieren können^[68]. Aber auch jede Sauerstoff verbrauchende Zelle hat verschiedene Möglichkeiten, auf Hypoxie zu reagieren. Die dann lokal ablaufenden Effekte beziehen sich initial nur auf die betroffenen Zellen und haben erst einen Einfluss auf den Organismus, wenn eine chronische Hypoxie besteht^[45]. Jedoch können diese vermeintlich kleinen Effekte massive Auswirkungen auf den gesamten Organismus haben und ganze Organsysteme binnen Monaten bis Jahren irreversibel schädigen (s. Kap. 1.3). Allgemein reagieren die meisten Zellen auf Hypoxie mit einer gesteigerten Aktivität von anaerob arbeitenden Enzymen sowie einer verminderten Aktivität ATP-verbrauchender Enzymsysteme, um Sauerstoff einzusparen. Darüber hinaus können Zellen verschiedener Organsysteme jedoch in unterschiedlicher Weise reagieren. Zum Beispiel kommt es in pulmonalen Gefäßen unter Hypoxie zur Vasokonstriktion, wohingegen die meisten anderen autonomen Organe mit einer Hypoxie-bedingten Vasodilatation reagieren^[63]. Wieder andere Organe, wie beispielsweise das Nierengewebe, beginnen mit der Produktion von Erythropoetin^[14].

1.2 Hypoxie in der Lunge

Die Lunge unterscheidet sich bezüglich ihrer Reaktion auf Hypoxie wesentlich von anderen Organsystemen. Wie bereits erwähnt wirkt akute alveoläre Hypoxie als potenter Vasokonstriktor auf den pulmonal-arteriellen Gefäßbaum. Allgemein kann der pulmonale Vasotonus, wie in anderen Gefäßen auch, ein Kontinuum zwischen der maximalen Vasokonstriktion bis zur maximalen Vasodilatation durchlaufen. Dazwischen liegt eine Art Ruhetonus, welcher unter normal-physiologischen Bedingungen sehr stark auf der Seite der Vasodilatoren liegt^[63].

Durch den physiologisch ablaufenden Prozess der Hypoxie-bedingten Widerstandserhöhung durch die Tonuszunahme der Lungenarterien wird der Blutstrom in besser ventilierte Areale umverteilt. Das Blut gelangt so von Zonen mit niedrigem PO_2 zu Arealen mit höherem PO_2 , was einen Abfall der Sauerstoffsättigung im Blut verhindern soll. Diese hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) wird auch als Euler-Liljestrand-Mechanismus bezeichnet^[103]. Es gibt verschiedene Hypothesen, wie es zu dieser Vasokonstriktion kommt, wobei ein multifaktorieller Prozess angenommen wird, welcher erst ansatzweise verstanden ist. Schon alleine über den initialen Schritt, also den Mechanismus, wie die Zellen den abfallenden Sauerstoffpartialdruck (PO_2) messen, gibt es verschiedene Theorien. Für die Lunge wird ein intrinsischer, also sich selbst regelnder, Mechanismus vermutet^[105]. Wesentlich ist eine Beteiligung der zellulären NAD(P)H-Oxidase und der mitochondrialen Atmungskette. Hierbei scheint die zelluläre NAD(P)H-Oxidase für die akute HPV (Sekunden bis Minuten) verantwortlich zu sein, wohingegen die mitochondriale Atmungskette für die HPV bei längerer Hypoxie (mehrere Stunden) zuständig zu sein scheint^[106]. Auch wird eine Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* (ROS)) angenommen, wobei kein Konsens darüber besteht, ob eine ansteigende oder abfallende Konzentration der ROS eine HPV auslöst. ROS sind schädliche Formen des Sauerstoffs, die unter anderem bei oxidativem Stress entstehen^[105].

So sinnvoll wiederum die HPV im gesunden Organismus und bei normalem Umgebungssauerstoff (21%) ist, so problematisch wirkt sie sich unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen aus. Globale oder verlängerte alveoläre Hypoxie, zum Beispiel aufgrund von chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen oder Aufenthalt in großer Höhe, führen dann durch die chronische Aktivierung der HPV zu Widerstandserhöhungen im pulmonal-arteriellen Kreislauf^[105]. Dieser anfänglich noch reversible Anstieg des mittleren pulmonal-arteriellen Drucks (PAP) kann bei fortbestehender HPV zu einer pulmonalen Hypertonie führen (s. Kap. 1.3). Diese fixiert sich im Verlauf durch einen nur anfänglich reversiblen Umbauprozess der Lungen-

gefäße (vaskuläres Remodeling) und führt zur konzentrischen und später auch exzentrischen rechtsventrikulären Myokard-Hypertrophie^[97]. Diese strukturelle Anpassung der intrapulmonalen Arterien betrifft alle Gefäßwandschichten und führt über eine Gefäßwandverdickung und Lumenreduktion der kleinen Lungenarterien zur o.g. Widerstandserhöhung^[43]. Hierbei unterscheidet sich das Remodeling der Pulmonalarterien entlang ihrer longitudinalen Achse von zentral nach peripher. In proximalen Gefäßen scheint die Verdickung der Media zu einem größeren Teil durch hypertrophierende und in ihrer Anzahl zunehmende glatte Muskelzellen zu entstehen, sodass mehr Fibroblasten, Myofibroblasten und zirkulierende Vorläuferzellen in der durch Hypoxie verdickten Media der Gefäße zu finden sind. Kleine, peripher gelegene Gefäße, welche primär über keine glatten Muskelzellen verfügen, bilden im Zuge von chronischer Hypoxie eine Teilmuskularisierung der Gefäßwand aus^[88].

Es gibt verschiedene Transkriptionsfaktoren, welche bei Hypoxie sowie Hypoxie-assoziierten Erkrankungen aktiv werden. Dem Transkriptionsfaktor Nfil6 (*nuclear factor interleukin 6*) wird eine antiinflammatorische Wirkung zugeschrieben. Er reguliert die Produktion von Interleukin-6 im Gefäßendothel. Egr1 (early growth response-1) steuert über Makrophagen die Produktion von Gewebefaktoren, welche unter hypoxischen Bedingungen zu Fibrinablagerungen im Gefäßsystem führen^[77]. Weiterhin sind bei der Reaktion des Gewebes auf Hypoxie die Transkriptionsfaktoren HIF1, HIF2 und HIF3 zu nennen.

Der wohl bedeutungsreichste Transkriptionsfaktor ist HIF1 (hypoxia-induced transcription factor 1), welcher als der globale Regulator des Sauerstoffgleichgewichts im Gewebe anzusehen ist^[78]. HIF1 ist ein Heterodimer, welches sich aus der Sauerstoff-regulierten Untereinheit HIF1 α und der Sauerstoff-unabhängigen HIF1 β -Untereinheit zusammensetzt. HIF1 α ist in den meisten Zellen der Lunge zu finden. HIF2 α , ein weiterer unter Hypoxie aktiver Transkriptionsfaktor, dessen Halbwertszeit ebenfalls vom Sauerstoffpartialdruck abhängig ist, kommt nicht in allen Zellarten der Lunge vor. Über die genaue Rolle von HIF3 ist in vivo noch wenig bekannt, wobei Kewley *et al.* vermuten, dass HIF3 in der Lunge eine Art negative Rückkopplung für HIF1 darstellt^[38]. Die Molekulargewichte von HIF1 α und β betragen 120 bzw. 91-94kDa. Beide enthalten die für Transkriptionsfaktoren typischen Domänen *basic helix-loop-helix* (bHLH) und Per-ARTN-Sim (PAS), wobei bHLH zum Binden von DNA nötig ist und PAS das Binden von Kofaktoren ermöglicht.^[36,38]

HIF1 α wird konstant exprimiert und unter normoxischen Bedingungen, nach vorheriger Hydroxylierung, an das von-Hippel-Lindau-Tumor-Suppressor-Protein (VHL) gebunden. Unter Normoxie findet so eine ständige Ubiquitinierung des Transkriptions-

faktors statt, wodurch bei Normoxie immer eine konstante Menge von HIF1 α in den Zellen vorhanden ist^[78]. Bei Hypoxie, sowohl akut als auch chronisch, hat die erniedrigte O₂-Spannung einen hemmenden Effekt auf die Enzyme, die den Abbau von HIF1 α katalysieren, was zu einer raschen Akkumulation des Proteins führt^[78]. Somit hat Sauerstoff einen Einfluss auf die Halbwertszeit, und hiermit auf die Aktivität von HIF1 α ^[38,78].

Es gibt zahlreiche Zielgene, welche durch HIF beeinflusst werden. Dazu zählen unter anderem Gene, die auf die Glykolyse, die Erythropoese und die Angiogenese Einfluss nehmen^[38]. Von HIF regulierte Gene verfügen über eine Nukleotidsequenz im Bereich eines Promoters, die der Bindung des Transkriptionsfaktors HIF auf der DNA dient. Folglich wird dadurch die Transkription des nachfolgenden Gens beeinflusst. HIF sucht hierfür die Hypoxie-Bindungsstellen (HBS) innerhalb der Hypoxie-responsiven-Elemente (HRE) auf. Diese findet man bei Genen, welche von Sauerstoff reguliert werden^[12]. Über die Bindung an ein HRE am 3'-Ende des Gens, welches für das Protein Erythropoetin kodiert, wurde HIF1 das erste Mal identifiziert^[79]. Erythropoetin beispielsweise besitzt, wie viele andere durch Hypoxie regulierte Gene, repetitive Bindungsstellen für HIF1 (HBS), welche als Kernsequenz die Nukleotid-Reihenfolge CGTG enthalten^[12,79]. Eine Liste HIF-regulierter Gene ist in Tab. 4.5 gezeigt.

1.3 Hypoxie-assoziierte Erkrankungen der Lunge und Beeinflussung anderer Organsysteme

Welche Auswirkungen phasenweise Hypoxie auf den Körper haben kann, zeigt sich am Beispiel der obstruktiven Schlafapnoe (OSA), bei der es durch einen repetitiven Kollaps der oberen Atemwege im Schlaf zu intermittierender Hypoxie kommt. Durch diese Episoden während der eigentlichen Nachtruhe kommt es zu kardiovaskulären Veränderungen, die nächtliche Herzrhythmusstörungen und Erkrankungen wie systemarterielle Hypertonie, koronare Herzkrankheit, Linksherzinsuffizienz sowie zerebrovaskuläre Erkrankungen nach sich ziehen^[76].

Wie das nachfolgende Beispiel der pulmonalen Hypertonie (PH) zeigt, ist die Lunge von chronischer Hypoxie oder längeren hypoxischen Phasen besonders betroffen. Unter dem Begriff der pulmonalen Hypertonie oder des Lungenhochdrucks werden alle Veränderungen der Lungengefäße zusammengefasst, welche zu einem erhöhten Widerstand in den Lungengefäßen führen. Das Vorliegen einer PH ist durch einen mittleren Druck von mehr als 21mmHg in Ruhe bzw. 28mmHg unter Belastung in den Lungenarterien gekennzeichnet^[24].

Diagnostisch lässt sich die PH in fünf Ursachengruppen unterscheiden, welche 2003 auf dem 3. Weltsymposium zur PH in Venedig, Italien, überarbeitet wurden^[24].

Pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH) [1.1 idiopathisch (IPAH); 1.2 familiär (FPAH); 1.3 assoziiert mit Kollagenosen (APAH), Rechts-Links-Shunts, portaler Hypertension, HIV/AIDS, Medikamenten, Einnahme von Drogen sowie sonstige Faktoren wie Speicherkrankheiten, Splenektomie, myeloproliferativ; 1.4 bei gesicherten venösen und kapillären Lungenerkrankungen; 1.5. persistierende PH bei Neugeborenen]

PH bei Linksherzerkrankungen [2.1 atrial oder ventrikulär, 2.2 valvulär]

PH assoziiert mit Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie [3.1 chronisch obstruktive Lungenerkrankungen; 3.2 interstitielle Lungenkrankheiten; 3.3 Schlafapnoe-syndrome; 3.4 Erkrankungen mit alveolärer Hypoventilation; 3.5 Höhenbewohner; 3.6 pulmonale Entwicklungsstörungen]

PH aufgrund chronischer thrombotischer und/oder embolischer Erkrankungen [4.1 Thrombembolien der proximalen Lungenarterien, 4.2 Obstruktion der distalen Lungenarterien, 4.3 Lungenembolien (Tumore, Parasiten, Fremdkörper)]

Sonstige Ursachen [Sarkoidose, Histiozytosis X, Lymphangioliomyomatose und Gefäßkompressionen von außen (Lymphknoten, Tumore, fibrosierende Mediastinitis)]

Ein erhöhter venöser Druck von Seiten des linken Herzens (Mitralstenose oder Kardiomyopathie) oder ein vermehrter Blutfluss in die Pulmonalarterien infolge eines Links-Rechts-Shunts (kardialer Septumdefekt, offener Ductus arteriosus) kommen als Ursache für eine PH in Betracht. Die weitaus häufigsten Auslöser einer PH sind Erkrankungen, die durch eine chronische alveoläre Hypoxie den präkapillären Widerstand der Pulmonalgefäße erhöhen. Dazu gehören vor allem die obstruktiven Atemwegserkrankungen (Adenoide im Kindesalter, COPD, Asthma bronchiale, zystische Fibrose, OSA), die durch alveoläre Hypoxie und die daraus folgende inadäquate Oxygenierung des Blutes vasokonstriktorische Reize auf die präkapillären Pulmonalgefäße ausüben^[82].

Einige Lungenerkrankungen können durch eine Reduktion des Gesamtquerschnitts der kapillären Lungenstrombahn und der damit verbundenen Steigerung des Blutflusses in den restlichen Lungengefäßen zu einem Anstieg des pulmonal-arteriellen Blutdrucks führen. Hierzu zählt das Lungenemphysem sowie einige interstitielle Lungenerkrankungen mit Fibrosierung^[72].

1.4 Hypoxie im Mausmodell

Im untersuchten Mausmodell der normobaren Hypoxie wurde der Sauerstoffanteil in der Atemluft von 21% (normal) auf 10% herabgesetzt. Ziel war es, hierdurch den alveolären O_2 -Partialdruck zu senken, welcher sich vereinfacht durch die Multiplikation von Barometerdruck und O_2 -Anteil der Außenluft errechnet.

Die Mäuse wurden in speziellen Boxen gehalten, in denen die zugeführte Luft für eine Dauer von 3h bzw. 24h auf den oben genannten Sauerstoffanteil von 10% gesenkt wurde. Die Hypoxie führte zu einer Hypoxämie, welche wiederum eine Stimulation der peripheren Chemorezeptoren (s. Kap. 1.1) zur Folge hatte. Ein direkt daraus folgender Effekt ist die Steigerung des Ventilations-Perfusions-Verhältnisses^[68]. Weiterhin kam es zum in Kap. 1.2 beschriebenen Euler-Liljestrand-Mechanismus, der über die niedrige O_2 -Spannung zu hypoxischer Vasokonstriktion führt^[63]. Da hierdurch naturgemäß der Sauerstofftransport nicht verbessert werden kann, führte der nun gesteigerte pulmonale Gefäßwiderstand zu einer chronischen Belastung des rechten Ventrikels und schließlich zu chronischen Umbauprozessen in Lunge und Herz^[28,57,104].

1.5 DNA-Microarray-Technologie

Microarrays ermöglichen es, das Expressionsmuster tausender Gene auf RNA-Ebene gleichzeitig und in einer schnellen sowie effektiven Art zu bestimmen^[20,33]. Die Anwendung der DNA-Microarray-Technologie wurde im Jahr 1995 erstmalig in einer Publikation erwähnt, wobei das Prinzip auf den von Edwin Southern in den 1970er Jahren entwickelten Dotblot zurückzuführen ist^[74]. Anhand der zahlreichen Publikationen, welche bei der NCBI-Datenbank PubMed seit Mitte der 1990er Jahre mit dem Begriff „Microarray“ verknüpft sind, zeigt sich die zentrale Bedeutung dieser Technologie in der heutigen Molekularbiologie. Existierten im Jahre 1995 bei PubMed lediglich 2 Publikationen, welche eine Verknüpfung zu Microarrays hatten, waren es im Jahre 2000 schon über 400 und im Jahre 2006 über 4600 Publikationen.

Das Anwendungsgebiet der Microarrays umfasst sowohl die unterschiedliche Genexpression in Gesundheit und Krankheit als auch Genexpressions-Veränderungen in physiologischen, pathophysiologischen und immunologischen Zusammenhängen^[20]. So werden z.B. die Veränderungen von Expressionsmustern bei Tumoren, Adipositas oder Diabetes mellitus Typ 2 beurteilt. Auch bei der Entwicklung neuer Medikamente oder Impfstoffe und deren Auswirkungen werden Microarrays genutzt^[20,56,90]. Änderungen der Genexpression und die sich daraus ergebenden Folgen für die Zelle und den Organismus sind komplexe Vorgänge. Mit Hilfe der Microarray-Technologie

werden Änderungen in den Signalwegen auf mRNA-Ebene erfasst. Dabei steht nicht unbedingt das An- oder Abschalten von Genen im Vordergrund, sondern vielmehr die Zu- oder Abnahme der mRNA-Kopien, die jeweils ein bestimmtes Gen codieren^[67].

Bei DNA-Microarrays lassen sich zwei Herstellungsarten unterscheiden, mit denen derzeit die meisten Experimente durchgeführt werden. Zum einen kommen Oligonukleotid-Microarrays (50-70mere) und cDNA-Microarrays zum Einsatz, bei denen vorproduzierte Oligonukleotide oder cDNA (deren Sequenzlänge sehr variabel sein kann), auf eine beschichtete Glasoberfläche aufgebracht werden^[65]. Eine weitere Technik synthetisiert die erforderlichen Oligonukleotide *in-situ*, das heißt direkt auf dem Microarray. Bei dieser Methode werden lediglich kurze Oligonukleotidsequenzen (25mere) auf dem Array aufgebracht^[20,33].

Im weiteren Ablauf gibt es verschiedene Vorgehensweisen, welche sich prinzipiell nicht wesentlich unterscheiden. Darum soll hier nur kurz auf eine Methode eingegangen werden, welche häufige Anwendung findet. Die an definierten Positionen immobilisierten Oligonukleotide werden während des Experiments mit fluoreszenzmarkierter cRNA oder mittels reverser Transkription gewonnener cDNA direkt auf den Microarray hybridisiert. Grundlage der cRNA / cDNA ist die mRNA des jeweiligen Untersuchungsguts. Das Kontrollmaterial ist hierbei andersfarbig markiert als das Testmaterial. Im Anschluss an die Hybridisierung wird das Fluoreszenzsignal (ein Laser regt die fluoreszenzmarkierte Nukleinsäuren an) für jede einzelne Position des DNA-Microarrays mittels eines Scanners ausgelesen^[20]. Um die so ermittelten, enorm großen Datenmengen in Expressionsprofile umrechnen zu können und die Ergebnisse innerhalb eines Arrays und zwischen mehreren verschiedenen Arrays vergleichbar zu machen, müssen die Daten im Anschluss sorgfältig analysiert und normalisiert werden, damit zum Beispiel systematische Fehler das wahre biologische Signal nicht verschleiern^[18,86].

2 Ziele der Arbeit

Hypoxie ist für einen Organismus und seine einzelnen Organsysteme eine Stresssituation, die zu verschiedenen Kompensationsmechanismen führt. Die Lunge nimmt hierbei einen besonderen Stellenwert ein, da sie im Gegensatz zu anderen Organen auf Hypoxie mit einer Vasokonstriktion reagiert. Bei beispielsweise schlecht ventilierten Arealen der Lunge ist dieser Mechanismus sinnvoll. Unter chronisch hypoxischen Bedingungen jedoch kommt es zu Umbauprozessen in den Lungengefäßen, die auf Dauer zu einem fixiert erhöhten pulmonalarteriellen Widerstand führen und in eine pulmonalen Hypertonie münden können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von Genexpressionsveränderungen im Lungengewebe zu frühen Zeitpunkten der Hypoxieeinwirkung. Die Genexpressions-Veränderungen nach 3h und 24h Hypoxie wurden mittels mRNA aus Mauslungenhomogenat mit Hilfe der Microarray-Technologie und der real-time-PCR erfasst und zum Teil mittels Immunhistochemie auf Proteinebene weitergeführt.

Zum einen sollten auf diese Weise bisher nicht bekannte Interaktionsfaktoren der ablaufenden Prozesse identifiziert werden. Zum anderen sollte ein globaler Überblick über die parallel ablaufenden, genregulatorischen Prozesse in der Lunge unter der oben genannten Fragestellung gewonnen werden. Die Hypoxie-regulierten Kandidaten-Gene sollten auf ihre Hif-abhängige Regulation untersucht werden. Zusätzlich sollten zelluläre Prozesse identifiziert und in Zusammenhang gebracht werden, um die Antwort der Lunge auf kurzzeitige Hypoxie besser verstehen zu können.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 TIERE

BALB/cAnNCrIBR Mäuse (männlich)

Charles River (Sulzfeld)

3.1.2 KLEINMATERIAL

Deckgläser (26x76mm, Glasdicke 0.13-0.17mm)

Langenbrick (Emmendingen)

Deckgläser (24x36mm)

Menzel-Glaser (Braunschweig)

Einwegspritzen (verschiedene Größen)

B. Braun AG (Melsungen)

Sterile Kanülen (verschiedene Größen)

B. Braun AG (Melsungen)

Microarray Hybridisierungskammer

Agilent (Waldbronn)

Mikrotom-Messer

Feather (Köln)

Objektträger (25x75x1.0mm)

Menzel-Glaser (Braunschweig)

Parafilm[®] M (Verschlußfolie)

Fisher Scientific (Schwerte)

Pipetten (1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl)

Eppendorf (Hamburg)

Pipettenspitzen (steril, 10-1000µl)

Fisher Scientific (Schwerte)

SuperFrost Plus Objektträger

R. Langenbrinck (Teningen)

Tissue-Tek[®]

Sakura Finetek (Shin-ohashi, Japan)

3.1.3 GERÄTE

ABI PRISM[®] Sequenz Detection System 7700

Applied Biosystems (Darmstadt)

Agilent 2100 Bioanalyzer[®]

Agilent (Waldbronn)

Axioskop Lichtmikroskop

Zeiss (Oberkochen)

Digitalkamera IVC KY-F75U

Hitachi (Tokio, Japan)

Gelelektrophoresekammern und Gelkämme

Bächler (Hölstein)

GeneTac Hybstation[®]

PerkinElmer (Waltham USA)

Kryostat[®] (Cryocut 3000)

Leica (Bensheim)

Mikroskop

Olympus (Hamburg)

Genpix 4100A Microarray-Scanner

Molecular Devices (Sunnyvale, USA)

NanoDrop[®] ND-1000

NanoDropTechnologie (Wilmington)

Polaroidfilm Typ 667	Bender (Hannover)
Schüttler Typ REAX 2000 („Vortexer“)	Heidolph (Schwabach)
Polaroid MP4 Land Sofortbildkamera	Bachofer (Reutlingen)
Waage PM 480 DeltaRange	Mettler (Gießen)
Zentrifugen:	
- Kühlzentrifuge Biofuge 15R	Heraeus Sepatech (Hanau)
- SpeedVac® (Vakuumzentrifuge)	Savant (Minnesota, USA)
- Centrifuge 5415D	Eppendorf (Hamburg)

3.1.4 REAGENZIEN UND PUFFER

Aceton (100%)	Roth (Karlsruhe)
Agarose (Top-Vision LE GQ)	Promega (Mannheim)
Agilent 22k, 60mer Maus-Oligo-Microarrays	Agilent (Waldbronn)
Agilent-Low-RNA-Input-Fluorescent-Linear-Amplification-Kit	Agilent (Waldbronn)
Agilent- <i>in-situ</i> -Hybridisation-Kit-plus	Agilent (Waldbronn)
Agilent-Waschlösung 1:	Agilent (Waldbronn)
- 700ml nukleasefreies Wasser	
- 300ml 20x SSC	
- 0.5ml 10% Triton X-102	
Agilent-Waschlösung 2:	Agilent (Waldbronn)
- 995ml nukleasefreies Wasser	
- 5ml 20x SSC	
- 0.5ml 10% Triton X-102	
Alkaline Phosphatase Conjugated Affinity-Purified Anti-Goat IgG-Antikörper (Rabbit)	Rockland (Gilbertsville USA)
Ampuwa-Wasser	Fresenius (Bad Homburg)
Blaupuffer (Ladepuffer)-Ansatz:	
- 900µl 5xTBE (s.u.)	Roth (Karlsruhe)
- 100µl Glycerin (98%)	Merck (Darmstadt)
- 1 Spatelspitze Bromphenolblau	
ChemMate Antibody Diluent	Dako (Hamburg)
Chloroform (100%)	Merck (Darmstadt)
Cy3-dCTP (1mM)	Amersham (Piscataway, USA)
Cy5-dCTP (1mM)	Amersham (Piscataway, USA)
Cyanine 3-CTP (10 mM)	PerkinElmer (Waltham USA)
Cyanine 5-CTP (10 mM)	PerkinElmer (Waltham USA)

dNTP-Mastemix für fluoreszenzmarkierte cDNA: <ul style="list-style-type: none">- 5mM dATP, dTTP, dGTP- 2mM dCTP	Invitrogen (Karlsruhe)
dNTP-Mastermix für PCR (10mM)	Eurobio (Raunheim)
DNA-Längenstandard <i>Hinfl</i> (50µl-Ansatz): <ul style="list-style-type: none">- 10µl phiX174 DNA / <i>Hinfl</i> Marker (1mg/ml)- 10µl 5x TBE (s.u.)- 10µl Blaupuffer (s.o.)- 20µl Ampuwa-Wasser (s.o.)	Promega (Mannheim)
DNase1-Kit	Qiagen (Hilden)
Ethanol (100% und 70%)	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma (Taufkirchen)
GenAmp 10X PCR Puffer II	Applied Biosystems (Darmstadt)
Glycergel	Dako (Hamburg)
Hämalaun	Merck (Darmstadt)
<i>Hinfl</i> -Marker phiX174	Promega (Mannheim)
Hyb Buffer (Hybridisierungspuffer)	MWG (Ebersberg)
Hydrogen-Chlorid	Roth (Karlsruhe)
Magnesium-Chlorid (MgCl ₂)	Sigma (Taufkirchen)
MMLV Reverse-Transkriptase	Applied Biosystems (Darmstadt)
MWG 50mer Maus-Oligo-Microarrays, 30k	MWG (Ebersberg)
Natrium-Hydroxid	Merck (Darmstadt)
Natrium-Chlorid (NaCl)	Roth (Karlsruhe)
Oligo-dT Primer (15-20mere)	Invitrogen (Karlsruhe)
PCR-Primer	MWG (Ebersberg)
Phenobarbital-Natrium	Apotheke Universität Gießen
Platinum [®] SYBR Green [®] qPCR SuperMix-UDG:	Invitrogen (Karlsruhe)
QIAquick-PCR-Purification-Kit	Qiagen (Hilden)
Random Hexamers (5 nmol)	Applied Biosystems (Darmstadt)
RNA-6000-Nano-LabChip-Kit	Agilent (Waldbronn)
RNA-6000 Ladder	Ambion (Huntingdon, USA)
RNAse Away	Molecular Bio Products (San Diego, USA)
RNAse-Inhibitor	Applied Biosystems (Darmstadt)
RNeasy-Mini-Kit	Qiagen (Hilden)

ROX Reference Dye	Invitrogen (Karlsruhe)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma (Taufkirchen)
Sodium-Citrat (SSC)	Sigma (Taufkirchen)
Superscript-II-Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
5x TBE-Puffer (Gebrauchsverdünnung 0,5x):	
- 54g Tris (s.u.)	
- 27.5g Borsäure	Merck (Darmstadt)
- 20ml 0.5M EDTA (pH 8.0) (s.o.)	
- 1000ml destilliertes Wasser	
TBS-Puffer 20 Liter Ansatz (pH 7.4-7.6):	
- 18g Tris Base (s.u.)	
- 137g Tris HCL (s.u.)	
- 175,6g NaCL (s.o.)	
- mit destilliertem Wasser auf 20 Liter auffüllen	
TE- Puffer:	
-10mM Tris (pH 7,6) (s.u.)	
-1mM EDTA (s.o.)	
TriFast	peqLab (Erlangen)
Tris Base	Merck (Darmstadt)
Tris HCL	Merck (Darmstadt)
Triton X100 (0,1%ig)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ultra-Pure Water, RNase free	Invitrogen (Karlsruhe)

3.1.5 SOFTWARE

AmiGO (Gen Ontologie Database)	www.geneontology.org
GenePix Pro 5.0	Molecular Devices (Sunnyvale, USA)
IrfanView 3.98	www.irfanview.com
limma-Paket ^[84,85]	http://bioinf.wehi.edu.au/limma
Microsoft® Excel 2002	Microsoft GmbH (Unterschleißheim)
Microsoft® Word 2002	Microsoft GmbH (Unterschleißheim)
Pathway-Express ^[39]	http://vortex.cs.wayne.edu
Primer Express PPC (Macintosh)	Applied Biosystems (Darmstadt)
R (Programmiersprache) ^[23]	www.r-project.org

3.1.6 DATENBANKEN

NCBI Entrez Gene	<i>www.ncbi.nlm.nih.gov</i>
GenBank ^{®[7]}	<i>www.ncbi.nlm.nih.gov</i>
KEGG ^[62] (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genoms)	<i>http://kegg.com/</i>
UniGene	<i>www.ncbi.nlm.nih.gov</i>
PubMed (National Center for Biotechnology Information)	<i>www.ncbi.nlm.nih.gov</i>

3.2 Methoden

3.2.1 HALTUNG DER MÄUSE UND PRÄPARATION DER LUNGEN

Männliche BALB/cAnNCrIBR Mäuse mit einem Gewicht von 22 bis 24g und einem Alter von 50 – 70 Tagen wurden in einer ventilierten Kammer normobarer Hypoxie ausgesetzt, wobei der Sauerstoffgehalt der Einatemluft bei 10% (FiO_2 0.10) lag. Mit Hilfe eines autoregulatorischen Kontrollsystems (O_2 controller model 4010, Labotect, Göttingen) konnte der Sauerstoffgehalt konstant gehalten werden, indem entweder Stickstoff oder Sauerstoff bei Bedarf ergänzt wurde. Überschüssige Feuchtigkeit wurde durch Kondensation über ein Kühlsystem abgeführt. Eine permanente Bindung des entstandenen CO_2 fand durch Natronkalk (Sodasorb CO_2 Absorbent, Grace, Columbia) statt. Die normoxischen Kontrollmäuse wurden unter sonst gleichen Bedingungen bei 21% O_2 -Gehalt (FiO_2 0.21) gehalten. Alle Tierexperimente in dieser Arbeit wurden von der Ethikkommission genehmigt (Regierungspräsidium Gießen, Nr.II25.3-19c20-15 GI20/10-Nr.22/2000)

Durch eine nicht letale Dosis Pentobarbital-Natrium (0.35mg/kg Kg; Wirkstoffklasse: Barbiturate) wurden die Tiere mittels einer intraperitonealen Injektion anaesthetisiert. Anschließend erfolgte eine mediane Sternotomie. Unter Einbringen eines Katheters in die rechte Herzkammer wurden mit Hilfe der noch erhaltenen Pumpleistung des Herzens die Lungengefäße mit einer 0.9%igen NaCl-Lösung unter einem Druck von 20cm Wassersäule gespült. Während der Lungenperfusion konnte die NaCl-Lösung über die ebenfalls eröffnete linke Herzkammer abfließen. Bei Erhalt eines blutfreien Abflusses wurden die Lungen jeweils in Höhe des Lungenhilus aus dem Thorax exzidiert und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Lungen bei -80°C aufbewahrt. Die Atmung und das Herz-Kreislauf-System waren somit bis Sekunden vor dem Abtrennen der Lungenarterien intakt. Bei dieser Präparation wurde auf ein schnelles Vorgehen und bis zum Durchtrennen der Lungenarterien auf einen aufrechterhaltenen Kreislauf geachtet. Hierdurch sollte ein späteres Verfälschen der Genexpression durch einen hypoxischen Zustand der Lunge während der Präparation ausgeschlossen werden.

Lungen, die später zur immunhistochemischen Untersuchung genutzt wurden, wurden kurz vor der Exzision über eine Trachealkanüle mit 800 μl vorgewärmtem Tissue Tek gefüllt, was zur Stabilisierung und Erhaltung der Luftwege beitragen sollte.

3.2.2 EXTRAKTION VON GESAMT-RNA AUS LUNGENHOMOGENAT

Um den Verlust an verwendbarem Material möglichst gering und die Qualität der gewonnenen Gesamt-RNA möglichst hoch zu halten, wurde während der RNA-Extraktion auf ein hohes Maß an Sauberkeit geachtet. Dazu zählte z. B. auch das Reinigen des Arbeitsplatzes und der Pipetten mit RNase Away.

3.2.2.1 ZELLYSE UND EXTRAKTION DER GESAMT-RNA

Die Lungen wurden bei -20°C in $10\mu\text{m}$ dicke Schnitte im Kryostat zerteilt und pro 35-45mg Gewebe in $500\mu\text{l}$ TriFast (Phenol/Guanidinisothiocyanat Extraktionsmethode) gelöst, um anschließend zusätzlich zu dieser chemischen Zellyse noch eine mechanische Homogenisierung durchzuführen. Diese erfolgte durch Aufziehen des Gewebe-TriFast-Gemisches mittels einer Einwegspritze und einer 20G Kanüle. Der beschriebene Vorgang wurde genutzt, um das gelöste Lungengewebe der jeweiligen Tiere zum ersten Mal zu durchmischen. Für beide Gruppen wurden separat die hypoxischen und die normoxischen Zellysate in einem 15ml Falcon-Gefäß gemischt, für 2min bei Raumtemperatur inkubiert und wieder zu je $500\mu\text{l}$ in Eppendorf Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die nun durchmischten Proben wurden entweder zur direkten Weiterverarbeitung mit $100\mu\text{l}$ Chloroform vermischt oder bis zur späteren Verwendung [erneute RNA-Extraktion z.B. zur real-time-PCR (s. Kap. 3.2.7.1)] bei -80°C gelagert. Die mit Chloroform versetzten Proben wurden vermischt, bis die Lösung ein milchig-rötliches Aussehen erlangte. Anschließend wurden die Proben für 10min auf Eis inkubiert. Die Phasentrennung wurde danach durch Zentrifugieren für 15min bei 4°C und $14000g$ herbeigeführt. Die drei Phasen gliedern sich in die untere, rote Phenol-Chloroform-Phase, die weiße, zähe Interphase und die obere, klar-wässrige und RNA enthaltende Phase, auf.

3.2.2.2 SÄULENAUFREINIGUNG DER GESAMT-RNA

Die wässrige Phase (s. Kap. 3.2.2.1) wurde vorsichtig abgenommen und mit dem gleichen Volumen 70%igen Ethanol vermischt. Ethanol ist nötig, um die Bindung der RNA auf der Säule (Silicagel Membran im *kit* enthalten) zu ermöglichen. Die nächsten Schritte folgten exakt dem RNeasy-Miniprep-Kit, welches auch die aufgeführten Puffer enthält. Insgesamt wurden pro Säule ca. 165mg Gewebe in Lösung aufgetragen und zum Binden auf der Säulenmembran bei Raumtemperatur und $8000g$ für 15s zentrifugiert. Ein erster Waschschrift wurde mit $350\mu\text{l}$ RW1 Puffer mit anschließendem Zentrifugieren für 15s bei Raumtemperatur und $8000g$ durchgeführt. Um eine spätere Interferenz möglicher Kontaminationen mit genomischer DNA zu minimieren, wurde

nun ein DNase Verdau mit dem RNase freien DNase1-Kit direkt auf der Säule durchgeführt. 10µl DNase1 wurden mit 70µl des im *kit* enthaltenen RDD Puffers gemischt, auf die Säulenmembran aufgetragen, bei 25°C für 30min inkubiert und erneut, entsprechend dem oben genannten ersten Waschschrift, mit 350µl RW1 Puffer gereinigt. Im Anschluss folgten die zwei letzten Waschschrte mit 500µl RPE Puffer bei 8000g, wobei beim ersten Waschen für 15s und beim zweiten für 2min zentrifugiert wurde. Die Membran wurde nun durch Zentrifugieren für 1min bei 8000g getrocknet, um danach die gebundene RNA mit 31.5µl ultrareinem RNase-freiem Wasser zu eluieren. Das Wasser wurde hierfür zuvor für 1min bei Raumtemperatur auf der Membran inkubiert und schließlich für 1min bei 8000g zentrifugiert. Die Proben wurden nun ein zweites Mal vermischt, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.3 QUANTITATIVE UND QUALITATIVE BEURTEILUNG DER GESAMT-RNA

Während der Experimente wurde an verschiedenen Stellen der Versuchsreihen eine Überprüfung der Qualität der gewonnenen biologischen Proben durchgeführt. Gerade bei der Arbeit mit RNA, welche sehr schnell durch Einwirkung von chemischen und physikalischen Einflüssen degradieren kann, ist neben einer sauberen Arbeitsweise auch eine Kontrolle der Integrität dieser sensiblen Nukleinsäuren angebracht.

3.2.3.1 UV-ABSORPTIONSSPEKTROPHOTOMETRIE

Das Quantifizieren der Gesamt-RNA erfolgte spektrophotometrisch durch Messen der UV-Absorption mittels des NanoDrop ND-1000. Das Messprinzip beruht darauf, dass ein Lichtstrahl mit einer bestimmten Wellenlänge und einer bestimmten Intensität durch die Probe bestimmter Dicke geleitet wird. Je nach Stoff wird Licht bestimmter Wellenlängen absorbiert. Anhand der Stärke der Absorption lässt sich mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Konzentration des Stoffes errechnen. Eine Messung mittels des NanoDrop ermittelt aus lediglich einer 1.5µl Probe ein Absorptionsspektrum in einem Wellenlängenbereich von 220 – 550nm, wobei die NanoDrop-Software das Maximum bei 260nm zum Berechnen der Menge an RNA heranzieht (s. Abb. 3.1). Aufgrund des zuvor durchgeführten DNase-Verdaus (s. Kap. 3.2.2.2) konnte eine Verunreinigung mit DNA weitgehend ausgeschlossen werden. Dies war nötig, da DNA ebenfalls ein Maximum bei 260nm besitzt und es somit zu Fehlbestimmungen der Menge an RNA hätte kommen können.

Hinweise auf Verunreinigungen mit Proteinen, Phenol oder anderen Rückständen lassen sich mit Hilfe des Quotienten aus der Absorption bei 260nm/280nm detektieren. Ein Quotient nahe 2.0 für RNA gilt als weitgehend kontaminationsfrei. Der Quotient aus der Absorption bei 260nm/230nm ist ebenfalls ein Maß für die Reinheit der Probe und kann z.B. Salzurückstände detektieren. Dieser beträgt dann ungefähr 1.8-2.2 und sollte nicht wesentlich kleiner sein^[59].

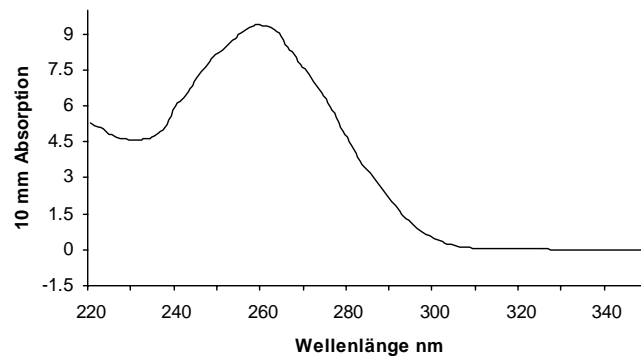


Abb. 3.1 Spektrophotometrische Messung der Gesamt-RNA

Dargestellt ist das Absorptionsspektrum der Gesamt-RNA in einem Wellenlängenbereich von 220-350nm. Bei 260nm ist ein deutliches Maximum zu sehen, anhand dessen die Berechnung der Menge an Gesamt-RNA mittels der NanoDrop Software durchgeführt wird (die Messung wird bei einer Pfadlänge von 1mm durchgeführt und anschließend auf eine theoretische Pfadlänge von 1cm hochgerechnet; dies erklärt die hohen OD-Werte).

3.2.3.2 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Ein Agarosegel besteht aus ladungsneutralen, langkettigen, polymerisierten Galaktose-Molekülen, welche ein dreidimensionales Netzwerk bilden, durch die die negativ geladenen Nukleinsäuren im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode wandern. Größere Moleküle bewegen sich langsamer und kleinere schneller durch das Gel, wodurch eine Auftrennung der Nukleinsäuren nach ihrer Größe und so eine Bildung von Banden aus Molekülen gleicher Länge erreicht werden. Diese sind dann aufgrund der vorherigen Zugabe von Ethidiumbromid, welches in Anwesenheit von Nukleinsäuremolekülen unter UV-Licht stark fluoresziert, sichtbar.

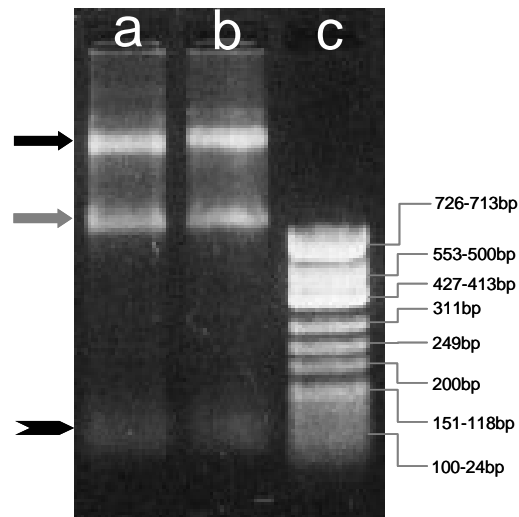


Abb. 3.2 Agarose Gelelektrophorese von Gesamt-RNA

Gezeigt sind zwei RNA Proben (a und b) und der Marker phiX174 DNA/*Hinfl* (c). Die für Maus-RNA typischen Banden der ribosomalen 18S ((\longrightarrow))(1.9kb) und 28S ((\longrightarrow)) (4.7kb) rRNA sind sowohl scharf voneinander als auch von der Umgebung abgrenzbar zu sehen. Ribosomale RNA nimmt, da ihr Anteil an der Gesamt-RNA über 80% ist, den größten Stellenwert in der qualitativen Untersuchung der RNA ein. Nur bei klarer Darstellung dieser Banden, das heißt ohne einen „Schmierfilm“ in Richtung kleinerer Bruchstücke (\longrightarrow), kann die RNA vom qualitativen Gesichtspunkt aus akzeptiert werden. Bei der Beurteilung der Gesamt-RNA war die klare Abgrenzbarkeit der rRNA-Banden wichtiger als eine genaue Längenbestimmung, weshalb der Marker lediglich zur groben Orientierung diente.

Für die RNA-Analyse wurde ein 1.5%iges Gel (0.75g Agarose Top-Vision LE GQ aufgekocht und gelöst in 55ml 0.5x TBE Puffer) gegossen. Nach 15min wurde das polymerisierte Agarosegel mit 0.5x TBE Puffer überschichtet. Pro Tasche wurde ca. 1µg RNA, welche zuvor mit Ladepuffer vermischt wurde, in einem Volumen von 10µl aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte im Anschluss mit einer Spannung von 80V für RNA [120V für DNA (s. Kap. 3.2.7.6)] für 30–40min, um anschließend die RNA-[bzw. DNA-] Banden unter einer UV-Lampe (322nm) sichtbar zu machen. Abb. 3.2 zeigt als Beispiel ein Polaroidbild zweier RNA-Proben.

Als Marker diente 1µl des phiX174 DNA/*Hinfl* mit Fragmentlängen von 24 bis 726 Basenpaaren.

3.2.3.3 KAPILLARELEKTROPHORESE

Zur quantitativen Bestimmung der RNA-Menge standen zwei Möglichkeiten zur Verfügung; zum einen der in Kap. 3.2.3.2 dargestellte NanoDrop und zum anderen der Agilent 2100 Bioanalyzer, mit dem auch eine qualitative Beurteilung möglich ist. Diese Technik der Mikrokapillarelektrophorese ermittelt während einer Messung an einer fixen Position der Kapillare kontinuierlich die induzierte Fluoreszenz des RNA-

sensitiven Farbstoffs. Statt Laufweiten nach einer fixen Zeit werden bei dieser Technik Laufzeiten für eine fixe Trennstrecke bestimmt. Anhand der Fluoreszenzintensitäten lässt sich dann die Menge an RNA berechnen und mittels der Laufzeiten eine qualitative Aussage über die Nukleinsäure treffen. Die graphische Darstellung erfolgte, wie in Abb. 3.3 zu sehen ist, als eine Funktion der Fluoreszenz gegen die Zeit, wobei kleine Nukleinsäuremoleküle an früheren Zeitpunkten sichtbar sind als große Moleküle. Hierbei wurde 1 µl einer Verdünnung der zuvor gewonnenen Gesamt-RNA der jeweiligen Proben mit einem Farbstoff, der in Anwesenheit von RNA nach Anregung stark fluoresziert, vermischt und in eine Kammer des RNA 6000 Nano Assay Chip geladen.

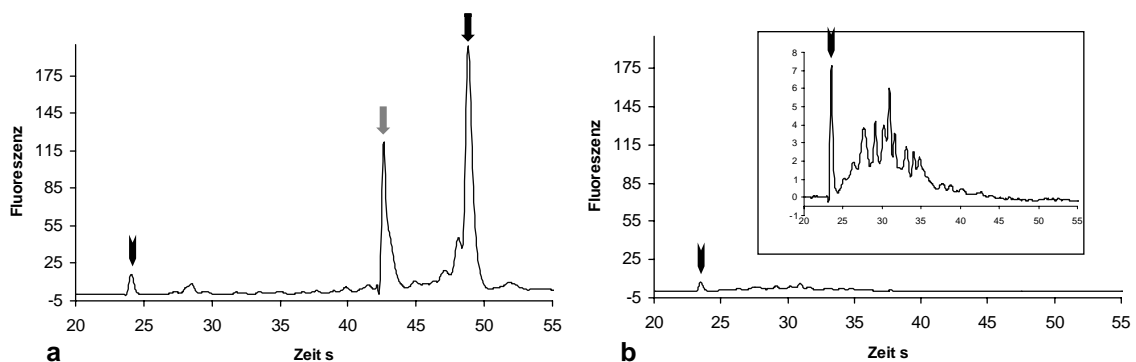


Abb. 3.3 Qualitative Beurteilung der Gesamt-RNA

Graph **a** zeigt die für eine hohe Qualität der Gesamt-RNA ausschlaggebenden Maxima der 18S (→) und der 28S (→) rRNA zu den dafür typischen Zeitpunkten. In Graph **b** ist eine geringe Menge RNA dargestellt, die durch Degradation lediglich kleinere Nukleinsäure-Bruchstücke bei sehr frühen Zeitpunkten zeigt. Um dies zu verdeutlichen wurde die Skalierung für diesen Abschnitt geändert und durch das kleine Zusatzbild in Graph **b** dargestellt. Der Scheitelpunkt des Markers (→) ist ebenfalls gezeigt.

3.2.4 cDNA-SYNTHESE MIT GLEICHZEITIGER FLUORESCENZ-MARKIERUNG

Zum Nachweis der Expressionsprofile mittels der Oligonukleotid-Arrays erfolgte eine Markierung der einzelsträngigen cDNA mit den Fluoreszenz-Farbstoffen Cy3 (Emissions-Maximum: 550nm) und Cy5 (Emissions-Maximum: 650nm). Bereits während der reversen Transkription der mRNA (ca. 2-5% der Gesamt-RNA) in cDNA werden die Cy3-dCTPs und Cy5-dCTPs komplementär zu den dGTPs des Ausgangsstranges eingebaut. Damit ein späteres dye-*swap*-Experiment (s. Kap. 3.2.5.2) durchgeführt werden konnte, wurde jede biologische Probe in getrennten Ansätzen sowohl Cy3 als auch Cy5 markiert.

Um für das Microarray-Experiment nur poly(A)-mRNA umzuschreiben, wurden 50µg Gesamt-RNA in einem Volumen von 17µl mit 1.5µg Oligo-dT-Primer [15-20mere] zunächst für 10min bei 65°C und anschließend für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Zugabe des Mastermix zum Starten der reversen Transkription wurde die Probe für 2min auf Eis gelagert.

Der Mastermix für die reverse Transkription wurde aus folgenden Reagenzien erstellt: 1.5µl (200U) des Enzyms Superscript II, des Weiteren die entsprechenden Mengen an RT-Reaction-Buffer und DTT (laut Angabe im Superscript-II-Kit) sowie 4µl dNTP-Mastermix für cDNA und 4µl 1mM Cy-markierte dCTPs wurden zusammengeführt. Es folgte eine Inkubation für 120min bei 39°C, dem Temperaturoptimum für das Enzym Superscript II, während der reversen Transkription. Gestoppt wurde die Reaktion durch Degradieren der RNA mittels Zugabe von 10µl 1M NaOH. Nach 10minütiger Inkubation bei 65°C wurde mit 10µl 1M HCL das Reaktionsgemisch wieder neutralisiert und mit 200µl TE Puffer versetzt.

3.2.5 cRNA-SYNTHESE UND T7-AMPLIFIKATION MIT GLEICHZEITIGER FLUORESZENZMARKIERUNG

Für die Agilent-Microarrays wurde mit Hilfe des Agilent-Low-RNA-Input-Fluorescent-Amplification-Kits fluoreszenzmarkierte cRNA aus 5µg Gesamt-RNA hergestellt. Die einzelnen Schritte wurden entsprechend des *kit*-Protokolls durchgeführt. Eine zusammenfassende Erläuterung der ablaufenden Reaktionsschritte wird im Folgenden kurz aufgezeigt. Um nur die mRNA umzuschreiben, wurde vor Beginn der reversen Transkription ein Oligo-dT-Primer beigefügt. Der nach der Transkription entstandenen doppelsträngigen cDNA wurde ein T7-Polymerase-Promoter für die T7-Amplifikation beigefügt. Mittels einer T7-RNA-Polymerase konnte nun, bei gleichzeitiger Inkorporation der Fluoreszenz-Farbstoffe Cyanine-3-CTP (Emissions-Maximum: 550nm) und Cyanine-5-CTP (Emissions-Maximum: 650nm) die cDNA in cRNA umgeschrieben werden. Um ein späteres *dye-swap*-Experiment (s. Kap. 3.2.5.2) durchzuführen, wurde jede biologische Probe sowohl Cyanine-3 als auch Cyanine-5 markiert.

3.2.5.1 SÄULENAUFREINIGUNG DER MARKIERTEN CDNA

Die markierte cDNA wird während der Waschschrte aufgrund hoher Salzkonzentrationen der Puffer selektiv an einer Silicagel-Membran gebunden. Etwaige Kontaminationen können dann mit den im QIAquick-PCR-Purification-Kit enthaltenen Puffern von der cDNA getrennt und somit ausgewaschen werden. Das Reinigen der

markierten cDNA erfolgte gemäß dem Protokoll für einzelsträngige DNA des *kits*. Als einzige Abwandlung wurde jedoch der Waschschrift mit dem im *kit* enthaltenen PE Puffer (750µl bei 10000g für 60s) dreimal anstatt nur einmal durchgeführt. Zum Eluieren wurde die Mindestmenge von 50µl destilliertem Wasser benutzt.

3.2.5.2 QUANTITATIVE UND QUALITATIVE BEURTEILUNG DER MARKIERTEN cDNA

Die fluoreszenzmarkierte cDNA wurde spektrophotometrisch mittels NanoDrop (s. Kap. 3.2.3) gemessen. Zum einen sollte die Menge cDNA und zum anderen die Einbaurate der jeweiligen Farbstoffe Cy3 und Cy5 bestimmt werden. Dies erfolgte mittels der Messergebnisse und der unten genannten Formeln.

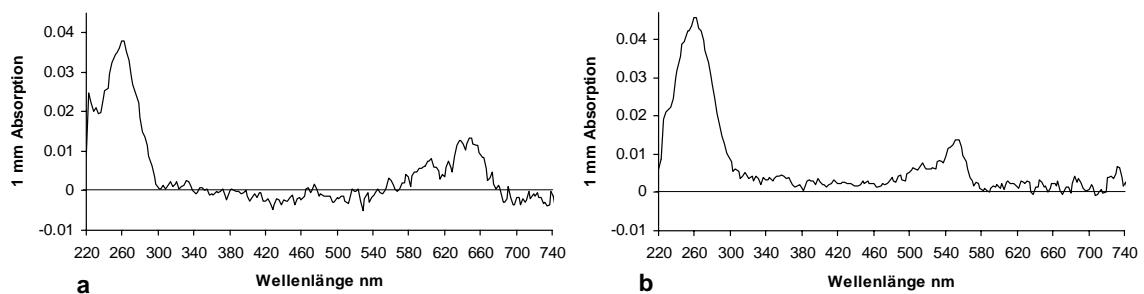


Abb. 3.4 Absorptionsspektrum von Cy-markierter cDNA

Beide Graphen zeigen bei 260nm das typische DNA-Maximum. In **a** ist bei 650nm, in **b** bei 550nm das jeweilige Maximum der beiden Farbstoffmoleküle Cy5(**a**) und Cy3(**b**) zu sehen.

Die Messungen und Berechnungen dienten dazu, fehlgeschlagene Markierungsreaktionen zu erkennen und die gleiche Menge an Cy3- und Cy5-markierter cDNA zur Hybridisierung einsetzen zu können.

Anhand der jeweilig ermittelten Absorptionsspektren (wie in Abb. 3.4 beispielhaft dargestellt) konnte sowohl die Quantifizierung der Farbstoffmenge als auch die Effizienz der Farbstoffmarkierung der cDNA in Form der Berechnung der Einbauraten durchgeführt werden. Folgende Formeln wurden hierfür verwendet, wobei mit dem Elutionsvolumen das in Kap. 3.2.5.1 genannte Volumen gemeint ist.

Menge Gesamt DNA[pmol]	=	$OD_{260} \times \text{Elutionsvolumen}[\mu\text{l}] \times 370[\text{pmol}/\mu\text{l}]$
Menge Cy3[pmol]	=	$OD_{550} \times \text{Elutionsvolumen}[\mu\text{l}] \times 67[\text{pmol}/\mu\text{l}]$
Menge Cy5[pmol]	=	$OD_{650} \times \text{Elutionsvolumen}[\mu\text{l}] \times 40[\text{pmol}/\mu\text{l}]$
Einbaurate Cy3[Cy/kb]	=	$OD_{550} / OD_{260} \times 58.5[\text{Cy}/\text{kb}]$
Einbaurate Cy5[Cy/kb]	=	$OD_{650} / OD_{260} \times 35.1[\text{Cy}/\text{kb}]$

3.2.6 MICROARRAY-EXPERIMENTE

Es wurden pro Hypoxiezeitraum (3h, 24h) 6 Hybridisierungen durchgeführt, wobei je 18 Tiere unter Hypoxie und weitere 18 unter Normoxie zufällig zu je drei Pools, jeweils bestehend aus 6 Tieren, aufgeteilt wurden (s. Kap. 3.2.2.1). Pro Pool wurde eine technische Wiederholung im Sinne eines Farbwechsels, dem so genannten *dye-swap* durchgeführt. Dieses Prinzip ist in Abb. 3.5 schematisch erklärt. Das *dye-swap*-Experiment dient einer Normalisierung, da hierdurch systematische Fehler ausgeglichen werden, die durch ein unterschiedliches Einbauverhalten der Farbstoffe Cy3 und Cy5 während der cDNA Synthese zustande kommen^[18,113].

Das Bilden von Pools wurde durchgeführt, um einen möglichen Einfluss biologischer Varianzen einzelner Individuen auf die Gesamtergebnisse zu minimieren. Hierbei wurde beachtet, dass die mRNA der verschiedenen Pools aus unterschiedlichen Extraktionen stammte. Mittels dieser Kombination aus biologischer (3x6 Tiere) und auch technischer Wiederholung konnte die Variationsbreite der Ergebnisse, welche bei Microarray-Experimenten häufig gegeben ist^[9,15], verkleinert werden. Eine Schätzung darüber, wie viele Tiere für technische sowie biologische Wiederholungen benötigt werden, erfolgte durch Dr. Inke König, Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität Lübeck.

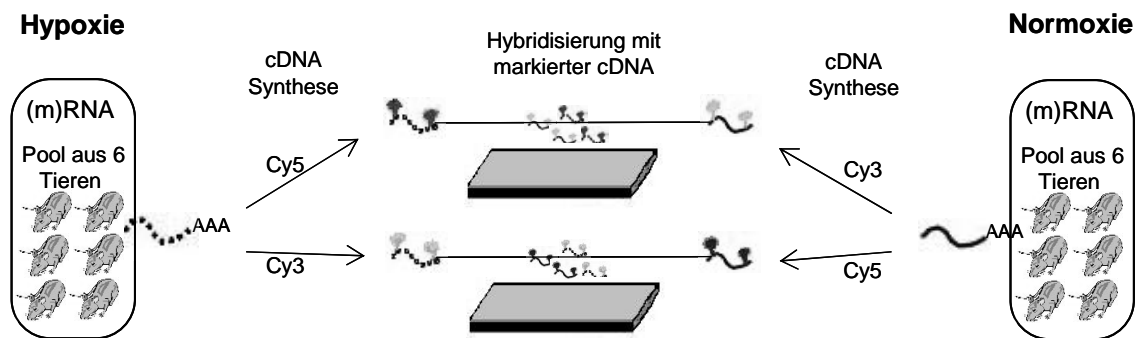


Abb. 3.5 Design eines *dye-swap*-Experiments am Beispiel eines normoxischen und hypoxischen Pools

Ein Pool besteht aus der (m)RNA von 6 Tieren. Diese wird nun mittels RT-Reaktion zu fluoreszenz-farbstoffmarkierter cDNA umgeschrieben, mit der jeweils andersfarbig markierten cDNA der Kontrollgruppe gemischt und gemeinsam auf einem Microarray hybridisiert. Dieser Vorgang wird im Sinne eines Farbwechsels, dem so genannten *dye-swap*, auf einem zweiten Microarray völlig identisch wiederholt, wobei der Unterschied darin besteht, dass die Proben, die zuvor Cy3 markiert waren, nun Cy5 markiert werden (und umgekehrt).

3.2.6.1 HYBRIDISIEREN, WASCHEN UND TROCKNEN DER MICROARRAYS

3.2.6.1.1 *Vorgehensweise bei MWG-Microarrays*

Zur Hybridisierung wurden 30k (30000 Gene) 50mer Maus-Oligo-Microarrays der Firma MWG benutzt. Beim Designen der einzelsträngigen 50mer Oligonukleotide wurde vom Hersteller mittels der Software Oligo4Array darauf geachtet, dass alle genspezifischen Oligonukleotide einen passenden GC-Gehalt und gleiche Hybridisierungstemperaturen haben sowie frei von Sekundärstrukturen und „Self-annealing“ Effekten sind.

Das Volumen der fluoreszenzmarkierten cDNA-Proben wurde in einer Vakuum-Zentrifuge auf weniger als 10µl reduziert. Diese so aufkonzentrierten Proben wurden anschließend mit 42°C warmem formamidbasiertem Hybridisierungspuffer (Hyp-Buffer) gemischt und auf ein Volumen von 135µl eingestellt.

Es folgte ein Denaturierungsschritt für 3min bei 95°C. Nach weiteren 3min Abkühlen auf Eis wurden die Proben in die bereits auf 42°C vorgeheizte Hybridisierungskammer der GeneTac-Hybstation mit einem darin liegenden Array injiziert. Dann wurde die Kammer verschlossen, sodass keine Flüssigkeit während der 16stündigen Hybridisierung bei 42°C entweichen konnte. Der Inhalt der Kammer stand während dieser Zeit unter ständiger Agitation, um ein möglichst gleichmäßiges Hybridisierungsergebnis zu erreichen.

Um nach erfolgter Hybridisierung die nicht oder unspezifisch gebundene cDNA von der Microarrayoberfläche zu beseitigen, wurde ein Waschprotokoll mit steigender Stringenz von Waschpuffer 1 bis 3 (1: 2xSSC, 0.1% SDS; 2: 1xSSC; 3: 0.5xSSC) gewählt. Die Arrays wurden je 5min in den jeweiligen Waschpuffer (Temperatur der Puffer 30°C) gegeben. Zum Trocknen wurden die Arrays in 15ml Falkons gesteckt, um sie sofort für 1.5min bei Raumtemperatur und 150g in der Zentrifuge zu trocknen.

3.2.6.1.2 *Vorgehensweise bei Agilent-Microarrays*

Im Testlabor der Firma Agilent wurden 22k (22000 Gene), 60mer Maus-Oligo-Microarrays benutzt. Die fluoreszenzmarkierten cDNA-Proben wurden mit ultrareinem Wasser auf ein Volumen von 250µl gebracht, für 3min bei 98°C denaturiert und für weitere 5min auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Hybridisierungslösung wurde durch Zugabe von 250µl 2x-Hybridisierungspuffer aus dem Agilent *in-situ*-Hybridisierungs-Kit-plus auf ein Volumen von 500µl aufgefüllt und durch Pipettieren vermischt. Die Arrays wurden in der Hybridisierungskammer befestigt und ca. 490µl des oben

genannten Volumens möglichst blasenfrei in die Kammer injiziert. Die Hybridisierung erfolgte im direkten Anschluss für 17h bei 60°C.

Um nach erfolgter Hybridisierung die nicht bzw. unspezifisch gebundene cDNA von der Microarrayoberfläche zu beseitigen, wurden die Arrays nach Entnahme aus der Kammer für einige Sekunden in die Agilent-Waschlösung 1 getaucht, um dann auf einem Rüttler für weitere 10min bei Raumtemperatur in ein Gefäß mit Agilent-Waschlösung 1 getaucht zu werden. Der finale Waschschrift erfolgte auf dem Rüttler für 5min in der Agilent-Waschlösung 2, welche zuvor auf ca. 4°C gekühlt wurde. Die Arrays wurden im Anschluss in einem 15ml Falcon bei Raumtemperatur und 150g für 2min in der Zentrifuge trocken geschleudert.

3.2.6.2 SCANNEN DER MICROARRAYS

Die Arrays wurden mit dem Genpix 4100A Microarray-Scanner mit einer Auflösung von 10µm pro Pixel gescannt, wobei die Intensitäten der beiden Laserkanäle des Scanners so gewählt waren, dass möglichst der gesamte dynamische Bereich genutzt wurde. Es wurde weiterhin darauf geachtet, dass eine vergleichbare Fluoreszenzintensität der beiden Farbstoff-Kanäle zustande kam.

3.2.6.3 BILDANALYSE UND GEWINNUNG DER DATEN

Die gewonnenen Rohdaten der jeweiligen Farbkanäle für Cy3 und Cy5 wurden als zweischichtige 16bit Graustufen Dateien im TIF-Format gespeichert und mittels der Software GenePix 5.0 analysiert.

Von jedem Spot wurden, wie in Abb. 3.6 dargestellt, das Vordergrundsignal durch Bildung des Mittelwertes der einzelnen Pixelintensitäten und der Hintergrund als Median aus den Pixelintensitäten bestimmt. Dies erfolgte jeweils getrennt für beide Farbkanäle.

Die Vorder- und Hintergrundintensitäten wurden als Dateien im GPR-Format (GenePix-results- Dateien) gespeichert.

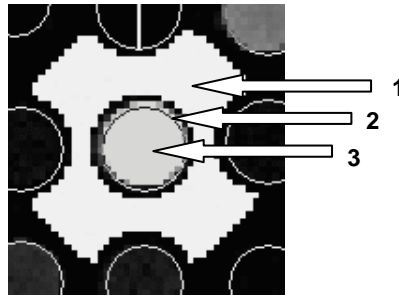


Abb. 3.6 Vorder- und Hintergrundberechnung der Spots

Spot und Umgebung lassen sich in drei Zonen einteilen: 1. Zone des lokalen Hintergrundsignals 2. Separationszone zur Trennung von Vordergrund- und Hintergrundzone 3. Vordergrundsignal (Zone des Spots) mit hybridisierten Proben.

3.2.6.4 DATENANALYSE

Mit Hilfe der Software R^[23] und dem limma Paket^[84-86] wurde die weitere statistische Ausarbeitung der Daten unter Mitwirkung von Dr. Jochen Wilhelm, Mitarbeiter im Z1-Projekt SFB 547, durchgeführt.

3.2.6.4.1 Erste Gütekriterien der Arrays und Spots

Die Qualität der Spots wurde anhand verschiedener Kriterien beurteilt. Spots mit verunreinigter Oberfläche durch beispielsweise Staubkörner wurden als „ungeeignet“ markiert und damit von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Ein weiterer Bestandteil der qualitativen Analyse war das Erstellen von *Spatial Plots*. Hierzu wurden, für beide Farbkanäle getrennt, die Vorder- von den Hintergrundintensitäten abgezogen, um sich so ein Bild über die Intensitätsverteilungen auf dem gesamten Array zu machen. Diese räumliche Darstellung dient unter anderem zur Aufdeckung von Kratzern auf dem Array. Weiterhin wurden *Spatial Plots* eingesetzt, um zu hohe bzw. zu niedrige Signale in bestimmten Regionen wie beispielsweise *print tip effects*, aber auch Zonen mit fehlender Hybridisierung sowie sonstige lokale Fehlerquellen auf dem Array aufzusuchen.

Ein weiterer wesentlicher Bestandteil der Datenanalyse befasste sich mit der Wichtung der einzelnen Spots. Unter Berücksichtigung der 3 Einflussfaktoren Intensität, Homogenität und Sättigung wurde, wie in der Wichtungsfunktion in Abb. 3.7 gezeigt, individuell für jeden Spot und jeden der 3 Einflussfaktoren ein Wichtungsfaktor zwischen 0 und 1 ermittelt.

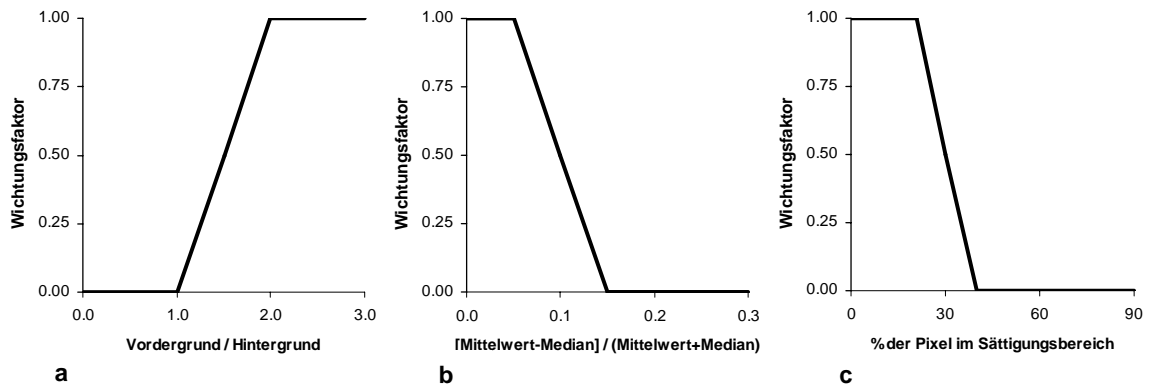


Abb. 3.7 Wichtungsfunktionen zur qualitativen Beurteilung der Spots

Wichtungsfunktionen für **a** Intensität, **b** Homogenität und **c** Sättigung

Als endgültiger Wichtungsfaktor pro Spot wurde das Produkt aus den 3 ermittelten Wichtungen verwendet, wobei jeweils der kleinere Wert der beiden Kanäle in diese Multiplikation einging.

3.2.6.4.2 Berechnung der Zielgrößen

Aus den GPR-Dateien (s. Kap. 3.2.6.3) wurden mit Hilfe der in Kap. 3.2.6.4 genannten Software die hintergrundkorrigierten Fluoreszenzintensitäten (s. Kap. 3.2.6.2) der einzelnen Spots bestimmt. Zielgröße war der Logarithmus des Verhältnisses der um den lokalen Hintergrund korrigierten Fluoreszenzintensitäten der Spots. Zur Korrektur des lokalen Hintergrundes wurde, getrennt für beide Kanäle, der Median der lokalen Hintergrundintensität von der mittleren Vordergrundintensität subtrahiert:

$$R = R_f - R_b$$

$$G = G_f - G_b$$

R_f , G_f : Mittlere Vordergrund-Intensitätswerte für die Cy3- und Cy5-Fluoreszenz des Spots

R_b , G_b : Mediane der entsprechenden lokalen Hintergrund-Intensitäten

R , G : Hintergrundkorrigierte Intensitätswerte der Spots

Der Logarithmus des Intensitäts-Verhältnisses berechnet sich nach:

$$M = \log_2(R/G)$$

Zur Analyse intensitätsabhängiger Artefakte in den Daten wurden die M-Werte gegen die entsprechende mittlere logarithmische Intensität

$$A = \frac{1}{2} \cdot \log_2(R \cdot G)$$

aufgetragen („MA-Plot“)^[10,23] (s. Abb. 4.3). Die so dargestellten Daten wurden vor der weiteren Analyse mittels einer gewichteten LOESS-Normalisierung^[18,86] korrigiert, um intensitätsabhängige Artefakte soweit wie möglich aus den Daten herauszurechnen (s. Abb. 4.4). Vergleicht man Abb. 4.3 mit Abb. 4.4 ist der Unterschied vor und nach der Normalisierung zu sehen.

Die M-Werte der verschiedenen Hybridisierungen wurden unter Berücksichtigung der Wichtungsfaktoren (s. Kap. 3.2.6.4.1) und der jeweiligen Markierungszuordnung mit einem generalisierten, linearen Modell aus dem limma-Paket^[84-86] gemittelt. Das Ergebnis des linearen Modells wird im Folgenden als *fit* bezeichnet. Die Koeffizienten des *fit* entsprechen den gewichtet gemittelten und Vorzeichen-justierten M-Werten, welche nun pro Gen als endgültige Werte aus den drei biologischen und zwei technischen Wiederholungen anzusehen sind. Ein „MA-Plot“ des *fit* ist in Abb. 4.6 zu sehen.

3.2.6.4.3 Statistische Auswertung

Um rein systematisch oder technisch bedingte Artefakte in den später ermittelten Daten auszugleichen, wurde eine Normalisierung der Daten durchgeführt. Solche Artefakte können beispielsweise durch verschiedene Effizienzen der Farbstoffmarkierung, durch verschiedenartigen Einbau der Fluoreszenz-Farbstoffe Cy3 und Cy5, Unterschiede beim Spotten aber auch durch unterschiedliche Scanning-Parameter der einzelnen Farbstoffe zustande kommen. So wird eine Vergleichbarkeit innerhalb eines Arrays und zwischen verschiedenen Arrays erreicht.

Eine robuste moderierte t-Teststatistik wurde verwendet, um die Gene nach der empirischen Wahrscheinlichkeit für differentielle Regulation zu ordnen^[84-86]. Die Nullhypothese des Tests lautet: der mittlere M-Wert ist Null. Die Alternativhypothese lautet: der mittlere M-Wert ist verschieden von Null (ungerichtete Hypothese). Die anhand der t-Werte ermittelten p-Werte wurden in B-Statistiken umgerechnet, wobei die Zahl der zu erwartenden differentiell regulierten Gene auf 1% gesetzt wurde^[84]. Je positiver der B-Wert ist, desto wahrscheinlicher ist die differentielle Expression des betreffenden Gens. Die B-Statistik ist auch unter der Bezeichnung *log odds ratio*, also dem logarithmierten Chancenverhältnis, bekannt.

Somit wurde ein Gen als reguliert bezeichnet, welches einen M-Wert größer/gleich 0.5 und einen B-Wert größer/gleich 5 aufweist.

3.2.6.4.4 Analyse der Kandidaten-Gene

Um die als reguliert gefundenen Kandidaten-Gene nach ihrer molekularen Funktion zu ordnen, wurde die Software AmiGo für Gen-Ontology genutzt. Weiterhin wurde eine KEGG-Signalweg-Analyse mit der Software Pathway-Express durchgeführt (s. Kap. 3.1.5). Für jeden Signalweg, in dem Kandidaten-Gene gefunden wurden, ermittelte die Software einen *impact factor*. Dieser berücksichtigt neben wahrscheinlichkeitstheoretischen Komponenten auch wichtige biologische Faktoren wie beispielsweise die statistische Signifikanz der involvierten Kandidaten-Gene, die Höhe des jeweiligen M-Werts und welche Position das differentiell exprimierte Gen im gegebenen Signalweg einnimmt. Außerdem wird berücksichtigt wie es im Signalweg mit anderen Genen interagiert^[22]. Es wurden nur Signalwege einbezogen, deren p-Wert < 0.05 war. Alle genannten Signalwege der Maus (*Mus musculus*) lassen mit zahlreichen weiteren, zusätzlichen Informationen auf der KEGG Homepage nachschlagen (s. Kap. 3.1.6).

Die jedem Gen zugeordnete GenBank *accession number* diente den genannten Analyse-Methoden als Identifikation der jeweiligen Gene.

3.2.7 QUANTITATIVE REAL-TIME-PCR

3.2.7.1 REVERSE TRANSKRIPTION (RT-REAKTION)

Als Transkription wird in der Genetik die Synthese von RNA anhand einer DNA als Vorlage bezeichnet. Bei der reversen Transkription (RT-Reaktion) hingegen wird aus vorhandener RNA ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert. Das Enzym aus der Enzymklasse „Reverse Transkriptase“, hier MMLV, ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase und synthetisiert DNA anhand einer RNA-Vorlage.

Aus den in Kap. 3.2.6 beschriebenen RNA-Pools wurde mittels der RT-Reaktion RNA in einen, zum RNA-Strang komplementären, cDNA-Strang umgeschrieben. Vom Prinzip her unterscheidet sich diese Reaktion nicht wesentlich von der cDNA-Synthese, welche in Kap. 3.2.3.3 durchgeführt wurde, außer, dass der dort verwendete Primer die cDNA vom Poly-A-Ende der RNA her synthetisiert. Hier wurden Hexanukleotid-Primer (Random Hexamere; 6 beliebig zusammengesetzte Basen) verwendet, welche die RNA dort umzuschreiben beginnen, wo sie eine Bindungsstelle finden.

1µg Gesamt-RNA wurde mit H₂O auf ein Volumen von 10µl gebracht und zur Denaturierung der RNA für 10min bei 70°C inkubiert.

Direkt danach wurde die Probe auf Eis für 5min abgekühlt und mit den zuvor angesetzten Bestandteilen der RT-Reaktion, dem so genannten Mastermix, zur Reaktion gebracht. Der Mastermix (10µl) wurde zuvor aus 2µl 10x Puffer II, 4µl MgCl₂ (25 mM), 1µl Random Hexamere (5nM), 0.5µl RNAase Inhibitor (20U/µl), 1µl MMLV-Reverse-Transkriptase (50U/µl), 0.5µl RNAse freies Wasser und 1µl dNTP-Mastermix hergestellt. Die Probe wurde zur Anlagerung der Primer (*annealing*) für 10min bei 20°C inkubiert. Es folgte nun für 75min der Reaktionsschritt der Polymerisation bei 43°C. Dies stellt für das Enzym die optimale Temperatur zum Ablauf der RT-Reaktion dar.

In einem finalen Schritt wurde die Probe für 5min auf 99°C erhitzt, um das Enzym zu denaturieren und damit die Reaktion zu beenden. Bis zur weiteren Verwendung der cDNA wurde diese bei -20°C aufbewahrt.

3.2.7.2 REAL-TIME-PCR MIT SYBR GREEN I

Die quantitative real-time-PCR, welche mit dem ABI PRISM Sequenz Detection System 7700 durchgeführt wurde, erfolgte stets für mehrere Gene gleichzeitig und unter Einsatz derselben Menge an Ausgangsmaterial sowie unter identischen PCR-Bedingungen. Für jedes Gen wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der anstelle der cDNA-Probe 2µl Wasser in den sonst identischen Reaktionsansatz gegeben wurden.

SYBR Green I ist ein Farbstoff, der seine schwache Grundfluoreszenz bei Anwesenheit von doppelsträngiger DNA durch seine Einlagerung in die kleine Furche stark erhöht und darum zum Nachweis von doppelsträngiger DNA, wie sie nach jeder Elongationsphase vorliegt, benutzt wird. So wurde über eine Korrelation zwischen der Menge des Amplifikats und der Signalstärke der Fluoreszenz eine Quantifizierung der vorhandenen DNA-Menge je Zyklus durchgeführt.

Reaktionsansatz (25µl):

12.5µl	Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (enthält u.a. SYBR Green I und die Platinum <i>Taq</i> -DNA-Polymerase)
1.0µl	50mM MgCl ₂
0.5µl	10µM Vorwärtsprimer
0.5µl	10µM Rückwärtsprimer
0.5µl	50x ROX Reference Dye
8.0µl	Wasser, Ultra-Pure
2.0µl	(ss)cDNA Probe (s. Kap. 3.2.7.1)

Der Reaktionsansatz wurde nun zum Aktivieren der Uracil Glycosylase (im oben genannten *kit* enthalten), welche den Reaktionsansatz von möglichen PCR-Produkt-Kontaminationen befreit, für 2min auf 50°C erwärmt. Im folgenden Schritt wurde er für 6min auf 95°C erhitzt, wodurch die Deaktivierung der Uracil Glycosylase und die gleichzeitige Aktivierung der *Taq*-Polymerase erfolgten. Nun folgten 45 Zyklen der eigentlichen PCR zu je 5s bei 95°C, 5s bei 59°C und 10s bei 72°C. Im direkten Anschluss wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (s. Kap. 3.2.7.6).

3.2.7.3 RELATIVE QUANTIFIZIERUNG

Zur Ermittlung der $\Delta\Delta C_T$ -Werte, aus denen Regulationsfaktoren errechnet werden können, wurde ein Experimentdesign gewählt, welches sowohl für die hypoxischen als auch für die normoxischen Proben des Lungenhomogenates pro Zeitpunkt drei biologische und zwei technische Wiederholungen umfasste.

Mit relativer Quantifizierung ist der Unterschied zwischen der Anzahl der cDNA-Kopien (im weiteren Sinne die Anzahl der mRNA-Kopien) nach Amplifikation der normoxischen Proben zu den hypoxischen Proben gemeint. Um diese relative Quantifizierung durchführen zu können, wurden Referenzgene verwendet, welche während der PCR-Läufe mitgemessen werden. Hierzu wurde das unter Hypoxie nicht regulierte Referenzgen porphobilinogen deaminase (*Pbgd*), ein ubiquitär, wie auch dauerhaft und konstant exprimiertes Gen, welches frei von Pseudogenen ist^[29,30], herangezogen. Des Weiteren wurde die hypoxanthin guanin phosphoribosyl transferase (*Hprt1*) verwendet. *Hprt1* wird ebenfalls konstant von den verschiedenen Zellarten der Lunge exprimiert^[102].

Die während des PCR-Laufs gesammelten Daten der Fluoreszenzänderung können graphisch dargestellt werden, indem man die Intensität gegen die Zykluszahl der Fluoreszenz aufrägt (s. Abb. 3.8). Die sich ergebenden Amplifikationskurven erreichen nach einem exponentiellen Anstieg schließlich eine Plateauphase. Der erkennbare exponentielle Signalanstieg ist umso früher, je mehr Kopien der Zielsequenz initial im Reaktionsansatz vorhanden sind.

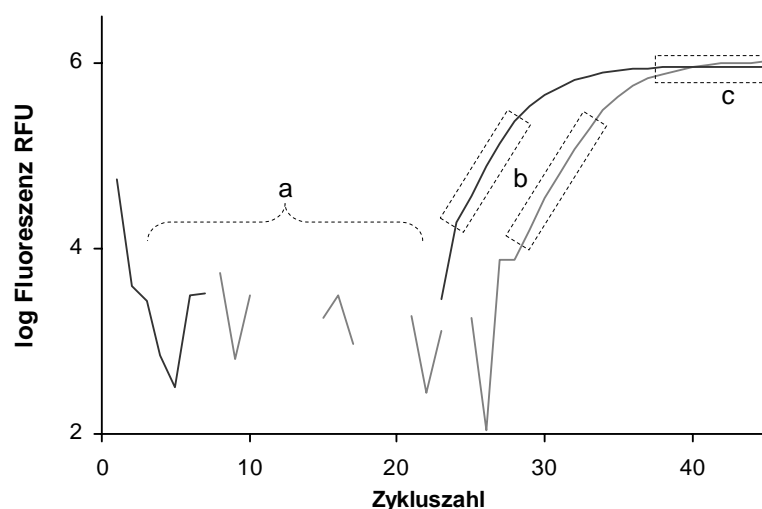


Abb. 3.8 Typischer Kurvenverlauf einer quantitativen PCR mit normoxischen und hypoxischen Proben am Beispiel von *Fst*

a Grundrauschen, **b** log-linearer (exponentieller) Bereich und **c** Plateauphase. Die erste Kurve zeigt den Verlauf der hypoxischen Probe. Die normoxische Probe erreicht den log-linearen Bereich erst mehrere Zyklen später.

Die Amplifikationskurven wurden vor der Analyse von der Mess-Software um den unspezifischen Hintergrund korrigiert. Dazu verwendet die Software die Fluoreszenzwerte der Zyklen 3 bis 15, anhand derer ein linearer Trend der Hintergrundfluoreszenz geschätzt wird. Dieser wird anschließend von den Messwerten subtrahiert.

Anhand der Amplifikationskurve wird für jede Probe der C_T -Wert (*Threshold Cycle* = Schwellenwert-Zyklus) bestimmt, welcher den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig über einen willkürlich festgelegten Schwellenwert steigt. Dieser Wert dient als Maß für die initiale Kopienzahl in einem Reaktionsansatz, sofern der Schwellenwert in der exponentiellen Phase der PCR überschritten wird. Im Experiment wird daher der Schwellenwert manuell so gewählt, dass er alle Kurven im log-linearen Verlauf schneidet. Der Schnittpunkt des Schwellenwerts mit der Amplifikationskurve ist der C_T -Wert.

Die relative Mengenbestimmung wird nun anhand der $\Delta\Delta C_T$ -Methode durchgeführt^[29]. Der $\Delta\Delta C_T$ -Wert berechnet sich nach folgender Formel:

$$\Delta\Delta C_T = [C_T^{(R)} - C_T^{(G)}]^{(HOX)} - [C_T^{(R)} - C_T^{(G)}]^{(NOX)}$$

$C_T^{(R)}$: C_T der Referenzgene *Pbgd* und *Hprt1*, jeweils für hypoxische (HOX) und normoxische (NOX) Proben

$C_T^{(G)}$: C_T des Zielgens in der hypoxischen (HOX) und normoxischen (NOX) Probe

Die $\Delta\Delta C_T$ -Werte können interpretiert werden als Logarithmus der relativen (Hypoxie versus Normoxie), auf das Referenzgen normalisierten Expressionswerte des Zielgens und sind damit vergleichbar mit den M-Werten der Microarray-Analysen. Mit Kenntnis der Amplifikationseffizienz ε würde sich der Faktor f (*fold-change*) der differentiellen Expression als

$$f = \varepsilon^{\Delta\Delta C_T}$$

ergeben. Da jedoch die Absolutwerte der Stärke der Hypoxie-bedingten differentiellen Expression für diese Arbeit nicht relevant sind, wurde grundsätzlich auf die Umrechnung von $\Delta\Delta C_T$ -Werten sowie von M-Werten in „*fold-changes*“ verzichtet.

Die einzelnen $\Delta\Delta C_T$ -Werte aus den zwei technischen und drei biologischen Wiederholungen wurden durch die Bildung von Mittelwerten zusammengeführt. Ein Gen wurde als reguliert bezeichnet, wenn der $\Delta\Delta C_T$ -Wert größer/gleich 0.5 lag (Vergleiche Definition M-Wert in Kap. 3.2.6.4.3). Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind in Abb. 4.16 und Abb. 4.17 zu sehen. Für jeden Wert wurde auch eine Standardabweichung errechnet und angegeben.

3.2.7.4 SCHMELZKURVENANALYSE UND AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Da anhand einer Amplifikationskurve mit SYBR Green I nicht entschieden werden kann, ob das Signal von einem spezifischen Produkt kommt, wurde im Anschluss an die Amplifikation eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Neben der Überprüfung der Spezifität der Primerpaare kann dieses Verfahren wichtige Hinweise auf unspezifische Amplifikationsprodukte wie beispielsweise Primerdimere geben und dient somit der qualitativen Überprüfung der zuvor durchgeführten Amplifikation. Hierbei werden die Reaktionsansätze im Anschluss an die PCR langsam und gleichmäßig von 60°C auf 95°C erwärmt, wobei kontinuierlich die Fluoreszenzintensität gemessen wird. Die Schmelztemperatur macht sich als plötzliche starke Fluoreszenzabnahme bemerkbar, welche als ein Maximum in der ersten negativen Ableitung dieser Funktion darstellbar ist. Diese Fluoreszenzabnahme erklärt sich durch den Übergang von doppelsträngiger (ds) zu einzelsträngiger (ss) DNA, dem so genannten Schmelzen. Bei diesem Vorgang wird der Farbstoff SYBR Green I in seine schwache Grundfluoreszenz zurückversetzt (s. Kap. 3.2.7). Die hierbei ermittelten Schmelztemperaturen konnten dann mit den für jedes Amplikon zuvor mit der Software Primer Express PPC (s. Kap. 3.2.7.1) errechneten Schmelztemperaturen verglichen werden.

Um sicher zu gehen, dass es sich bei den entstandenen Amplifikaten auch hinsichtlich der Amplifikatlänge um das erwünschte Produkt handelt, wurde für jedes Primer-Paar eine Gelelektrophorese in 2.5%igem Agarose-Gel durchgeführt (s. Abb. 4.15). Wie in genannter Abbildung zu sehen, wurden Negativkontrollen für jedes zu testende Amplikat mitgeführt. Art und Weise dieser Elektrophorese unterscheiden sich bis auf die Agarosekonzentration des Gels nicht von der in Kap. 3.2.3.2 beschriebenen Methode.

3.2.7.5 DESIGN DER PRIMERPAARE

GeneBank Nummer	Genname (offizielles Symbol)	Sequenz von 5' - 3' VP/RP	PCR-Produktlänge	Exon-position VP / RP
M28663	porphobilinogen deaminase (Pbgd)	GGTACAAGGCTTTCAGCATCGC/ ATGTCCGGTAACGGCGGC	135 bp	E1 / E2
NM_013556	hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (Hprt1)	CCTCATGGACTGATTATGGACAGG/ GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC	124 bp	E2 / E3
NM_008827	placental growth factor (Pgf)	TGCAGATCTTGAAGATTCCCC/ CCTCCTTTCTGCCTTTGTCG	119 bp	E5 / E6
NM_016974	d site albumin promoter binding protein (Dbp)	CACCGCTTCTCAGAGGAGGA/ TCTTGACCTCCGGCTCCAG	112 bp	E3 / E4
S67218	transferrin (Trf)	ACAGAACCGCTGGTTGGAAC/ ATTCTTCTCATACCCGGGAGC	110 bp	E12 / E13
NM_009760	bcl2/adenovirus e1b 19 kda-interacting protein 1 (Bnip3)	TTGGCGAGAAAAACAGCACTC/ TGGTCGACTTGACCAATCCC	113 bp	E3 / E4
NM_008046	folistatin (Fst)	GCGAGTGTGCCATGAAGGA/ CCTCCGTTTCTTCCGAGATG	96 bp	E5 / E6
AF326555	phosphodiesterase 4b (Pde4b)	ACGTGGCCCAGTCAACTCA/ GATCGACATCATGGATGGCA	111bp	E10 / E11
NM_016693	mitogen-activated protein kinase kinase 6 (Map3k6)	CGAGATGGCAACAGGTCTGA/ CAAAAGTTCGGAGGAGGAAGG	143 bp	E19 / 20
NM_010220	fk506 binding protein 5 (Fkbp5)	GAACCTGGCCATGTGCTACC/ CTCGCCCCTTCTGTACAAGC	115 bp	E8 / E9
NM_133662	immediate early response 3 (Ier3)	GTTTGAACACTTCTCGCGGG/ TGGCGAACAGGAGAAAGAGG	126 bp	E1 / E2
NM_019466	down syndrom critical region (Dscr1)	TTCAGCGAAAGTGAGACCAGG/ ATCCGGACACGTTTGAAGCT	101 bp	E1 / E2
NM_013867	breast cancer anti-estrogen resistance 3 (Bcar3)	TGAGCTCTGGGTTGGAGCTC/ GCCCAGAATGTCCACAGCA	110 bp	E8 / E9
NM_020509	resistin like alpha (Retnla)	TATGAACAGATGGGCCTCCTG/ TCCACTCTGGATCTCCCAAGA	91 bp	E3 / E4
NM_011580	thrombospondin 1 (Thbs1)	ACAGTTGCACAGAGTGTCAGTGC/ CATTCAACATCAGGAAGTGTGG	103 bp	E6 / E7

Tab. 3.1 Primer Sequenzen

VP = Vorwärtsprimer, **RP** = Rückwärtsprimer, **bp** = Basenpaare, **E** = Exon

Die beiden Primer pro Gen wurden spezifisch für einen ganz bestimmten Abschnitt innerhalb der Gensequenz mit Hilfe der Software Primer Express PPC intron-überspannend konstruiert, was ein Amplifikationsprodukt aufgrund von Verunreinigung durch genomische DNA nahezu ausschließt.

Anhand der *accession number* wurden die Sequenzen jedes Gens bei GenBank^[7] ermittelt (s. Tab. 3.1). Um die PCR-Bedingungen für alle Primer ähnlich zu gestalten, wurde bei ihrer Konstruktion darauf geachtet, die *Annealing*-Temperatur (Temperatur, bei der sich der Primer an die DNA anlagert) auf 59°C (+/- 1°C) zu optimieren und PCR-Produkte (Amplikon) mit Fragmentlängen von 90-145bp zu erhalten. Zusätzlich

wiesen die Primer einen GC-Gehalt von 40-60% auf und es wurde beachtet, dass die Primer keine repetitiven Sequenzen beinhalten.

3.2.7.6 VALIDIERUNG DER PRIMERPAARE

Die Überprüfung der Effizienz (ϵ) der Primerpaare wurde durchgeführt, um eine Aussage über die Qualität der konstruierten Primer machen zu können. Niedrige Effizienzen würden die Sensitivität und damit die Aussagekraft des Experiments mindern. Der theoretisch maximale Wert für ϵ ist 2.0 (hier würde die Ausgangsmenge pro Zyklus verdoppelt werden). Jedoch kann dieser Wert im realen Experiment je nach Primer zwischen 1.5 und 1.9 schwanken^[110].

Mit jedem Primerpaar wurde eine PCR mit je 2 μ l einer 1:10- und einer 1:100-verdünnten cDNA durchgeführt, die jeweiligen C_T -Werte (s. Kap. 3.2.7.3) ermittelt und aus der Zyklusdifferenz zwischen den Verdünnungen mit Hilfe der folgenden Formel die Effizienz (ϵ) bestimmt. Pro Verdünnung wurden drei technische Wiederholungen vorgenommen.

$$\epsilon = 10^{(1/Z)}$$

(Z: Zyklusdifferenz aus dem Zyklus-Mittelwert der 1:100-er Verdünnung subtrahiert vom Zyklus-Mittelwert der 1:10-er Verdünnung)

3.2.8 IMMUNHISTOCHEMIE VON MAUSLUNGENGeweBE

Mit Tissue-Tek gespültes Lungengewebe wurde auf SuperFrost-Objektträgern als Gefrierschnitt der Dicke 10 μ m aufgebracht. Die Schnitte wurden über Nacht getrocknet und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Die Fixierung erfolgte für 10min in Aceton. Danach wurden die Schnitte getrocknet und mit einem Fettstift umrandet, um ein späteres Vermischen der Antikörperverdünnung mit der Negativkontrolle zu vermeiden. Im Anschluss erfolgte eine 30minütige Inkubation in 0.1%iger Triton X100 Lösung. Danach wurde dreimal mit TBS gewaschen. Die jeweiligen Primär-Antikörper wurden, wie in Tab. 3.2 dargestellt, mittels ChemMate Antibody Diluent verdünnt. 100 μ l dieser Verdünnung wurden dann bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer auf den Gewebeschnitt aufgetragen, wobei die Inkubationsdauer für jeden Antikörper variierte (s. Tab. 3.2). Der Inkubation folgten drei weitere Waschschrte mit TBS.

Danach wurden die Schnitte nach der APAAP-Methode (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode) mit 100 μ l Alkaline Phosphatase Conjugated Affinity Purified Anti-Goat IgG-Antikörper (Rabbit) in der Verdünnung 1:200 für 45min inkubiert

und danach achtmal mit TBS gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen.

Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte 45s in Hämalun getaucht und danach mehrfach in Wasser gespült. Bei einer Hämalun-Färbung handelt es sich um eine spezifische Kernfärbung. Schließlich wurden die Präparate mit der Glyceringelatine Glycergel überschichtet und mittels eines Deckglases versiegelt.

Um eine unspezifische Farbreaktion auszuschließen, wurden jeweils Negativkontrollen unter Ausschluss des Primärantikörpers (das Volumen wurde durch Puffer ersetzt) bei sonst identischer Färbeprozedur durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte qualitativ am Lichtmikroskop.

Antikörper	Antikörper-Art	Herkunft	Verdünnung / Inkubationsdauer	Firma (Firmensitz)
BCAR3 (OBT1368)	Primär-Antikörper	Ziege	1:60 / über Nacht	Biozol (Eching)
Resistin-like α (E-19) Fizz1	Primär-Antikörper	Ziege	1:1000 / über Nacht	Santa Cruz (Heidelberg)
Goat Anti-Rabbit Affinity Purified IgG (H+L)	Sekundär- Antikörper	Ziege	1:150 / 30min	SouthernBiotech (Birmingham, USA)
Alkaline Phosphatase Conjugated Affinity Purified Anti-Goat IgG	Sekundär- bzw. Tertiär-Antikörper	Kaninchen	1:200 / 45min	Rockland (Gilbertsville, USA)

Tab. 3.2 Zum immunhistochemischen Protein-Nachweis verwendete Antikörper

4 Ergebnisse

4.1 Microarray-Experiment

Die aus Mauslungenhomogenat synthetisierte und fluoreszenzmarkierte cDNA (s. Kap. 3.2.4) wurde auf MWG-30k-Microarrays (s. Kap. 3.2.6) hybridisiert. Abb. 4.1 (a + b) zeigt je einen der 48 Blocks zweier Microarrays am Beispiel eines *dye-swap*-Experiments (s. Kap. 3.2.6). Obwohl die gezeigten Fluoreszenzwerte erst normalisiert werden müssen, lässt sich hier bereits eine Hochregulation zweier Gene vermuten.

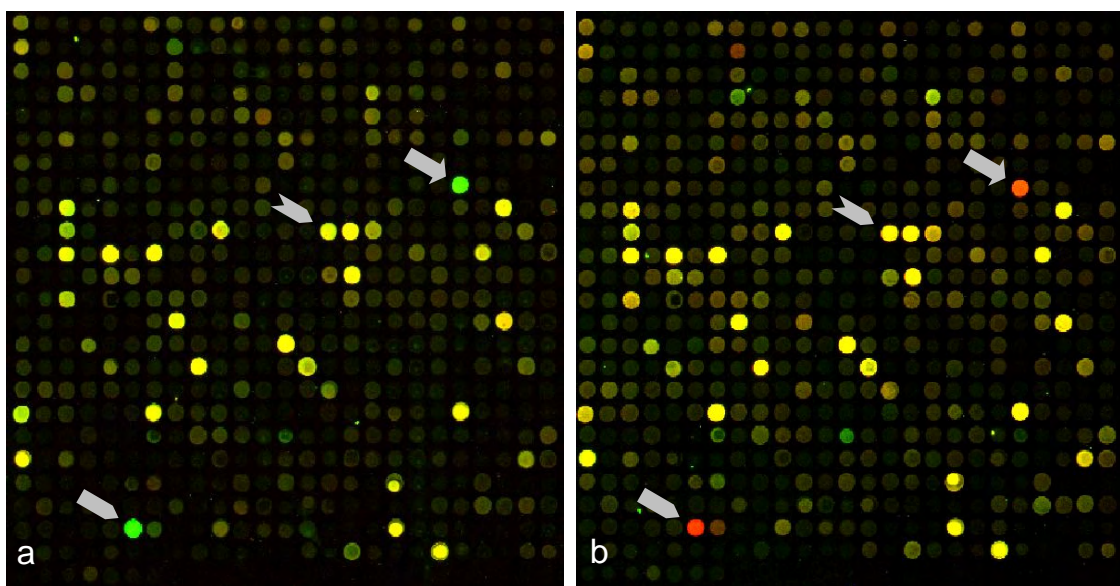


Abb. 4.1 Beispiel unterschiedlicher Genexpressionen im Lungenhomogenat (nach 24h Hypoxie)

Fluoreszenzintensitäten zweier Arrays im Rahmen eines *dye-swap*-Experiments nach Hybridisierung von markierter cDNA. Dargestellt ist jeweils einer von 48 Blocks (\approx ca. 625 Genen [von insgesamt 30000 Genen pro Array]). In **a** sind die hypoxischen Proben Cy3 (grün), in **b** Cy5 (rot) markiert. (\rightarrow) zeigt die veränderten Fluoreszenzintensitäten des Gens *resistin-like-alpha* und (\rightarrow) zeigt die des *resistin-like-alpha-precursors*. Das Gen *alcohol-dehydrogenase-family-1 (subfamily-a1)* ist als Beispiel eines nicht regulierten Gens angeführt (\rightarrow). Hier sind keine Fluoreszenzunterschiede zwischen **a** und **b** erkennbar.

4.1.1 QUALITATIVE BEURTEILUNG DER EINZELNEN HYBRIDISIERUNGEN

In Abb. 4.2 wurden die Boxplots der logarithmierten Fluoreszenzintensitäten der Spots und des Hintergrundes der für die Experimente verwendeten Microarrays dargestellt (s. Kap. 3.2.6.1.1). Je Zeitpunkt der Hypoxie (3h und 24h) wurden jeweils sechs Arrays hybridisiert. Man sieht den deutlichen Unterschied zwischen den Intensitäten der Spots, verglichen mit denen des Hintergrundes, was als qualitative Grundlage für den

späteren Aussagewert der Daten wichtig ist. In Abb. 10.1 ist ein Boxplot zweier Microarrays einer defekten Charge gezeigt. Man sieht die deutlich reduzierte und bei 635nm nicht einmal darstellbare Fluoreszenzintensität der Spots. Auch der sehr geringe Unterschied zwischen den Spot- und den Hintergrundintensitäten bei 535nm macht eine spätere Datenauswertung schwierig.

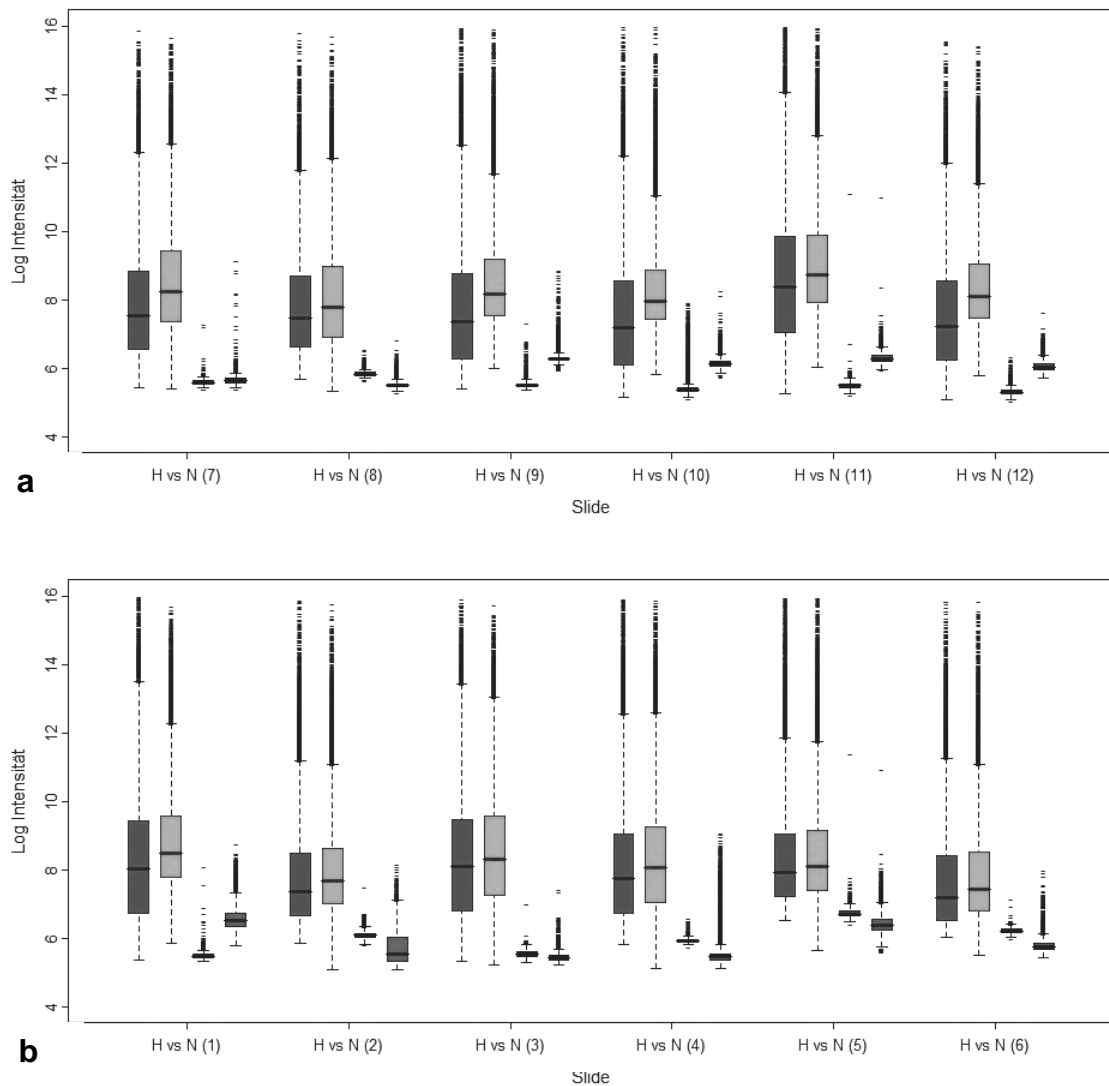


Abb. 4.2 Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Microarrays

a zeigt die logarithmisch dargestellten Fluoreszenzintensitäten der 3h-, **b** die der 24h-Hypoxie-Gruppe. Jedem einzelnen Array (H vs. N = Hypoxie versus Normoxie; Nummer 1-12) sind vier Spalten zugeordnet, wobei die ersten beiden die Intensitäten der Spots und die letzten beiden die Hintergrundintensitäten für die Wellenlängen 635nm (rot) bzw. 535nm (grün) zeigen. Der Median der Fluoreszenzintensität ist durch die horizontale Linie gezeigt, die sich innerhalb des jeweiligen Interquartils (dunkelgraue oder hellgraue Box) befindet. Die Höhe der Box entspricht dem Interquartilsabstand, in dem 50% aller Werte liegen. Die Länge der Whisker (gestrichelte Vertikale ober- und unterhalb der Box) wird durch den 1,5-fachen Interquartilsabstand festgelegt. Werte ober- und unterhalb der Whisker sind als Einzelwerte durch kurze horizontale Striche gezeigt.

4.1.2 ERGEBNISSE DES MICROARRAY-EXPERIMENTS

Nachdem anhand der Fluoreszenzintensitäten die M- und A-Werte berechnet waren (s. Kap. 3.2.6.3 und Kap. 3.2.6.4), wurden die gewonnenen Daten, wie in Abb. 4.3 zu sehen, mittels MA-Plots dargestellt. Abb. 4.4 zeigt die MA-Plots nach Normalisierung.

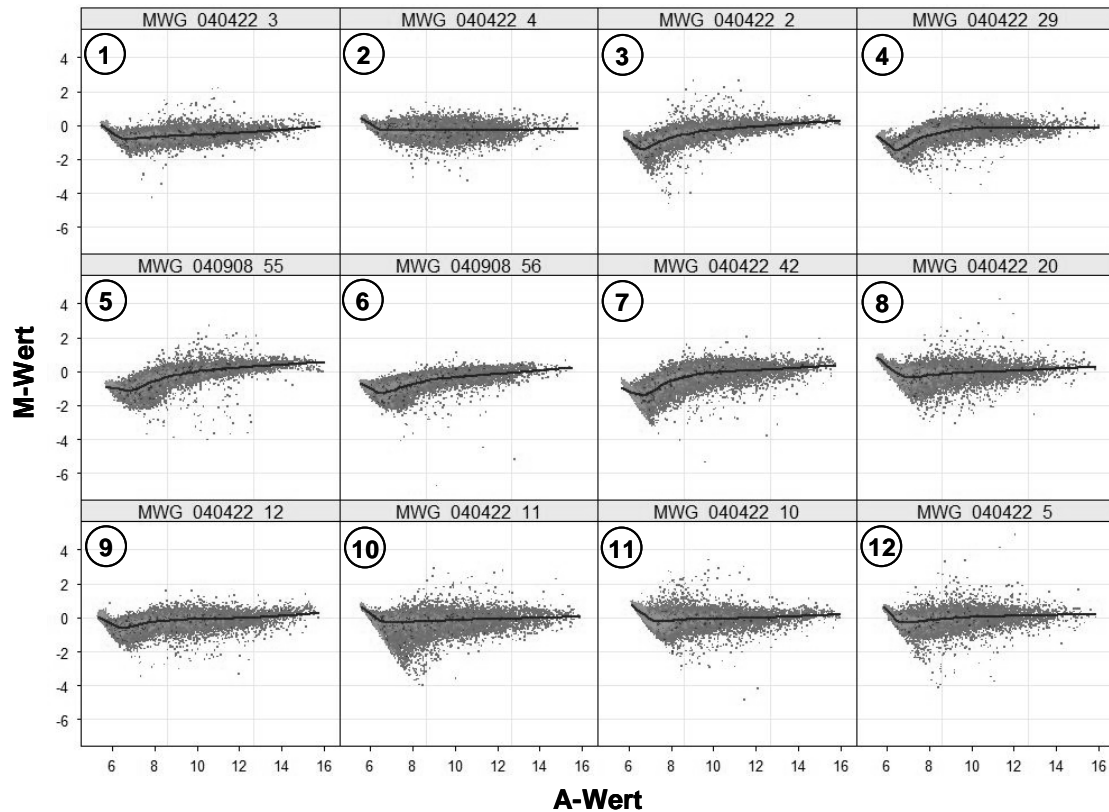


Abb. 4.3 MA-Plots vor Normalisierung

Daten vor Hintergrundkorrektur und Normalisierung: Die Nummern 1-6 zeigen alle MA-Plots des 3h-Hypoxie-Experiments; die Nummern 7-12 die des 24h-Hypoxie-Experiments. Der logarithmische Quotient der Intensitäten beider Kanäle ($M\text{-Wert} = \log_2(R/G)$) und die durchschnittliche Intensität ($A\text{-Wert} = \frac{1}{2} \cdot \log_2(R \cdot G)$) sind gegeneinander aufgetragen. Die schwarze Linie in den MA-Plots zeigt den Median der Fluoreszenzintensität für jeden Microarray.

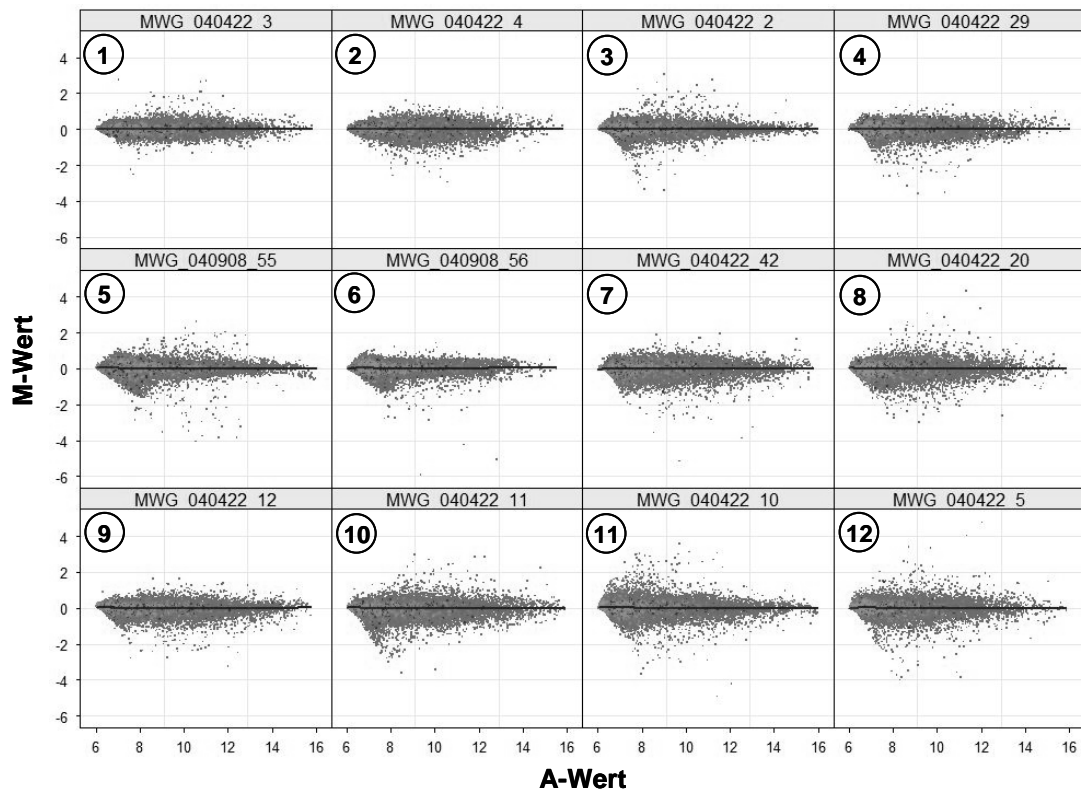


Abb. 4.4 MA-Plots nach Normalisierung

Vergleiche mit Abb. 4.3.

Obwohl Abb. 4.3 die Daten vor Hintergrundkorrektur und Normalisierung zeigt, sieht man schon, dass die M-Werte in der 24h-Hypoxie-Gruppe mehr streuen als in der 3h-Hypoxie-Gruppe. Dies liefert einen ersten Hinweis dafür, dass nach 24h Hypoxie mehr Gene reguliert sind als nach 3h Hypoxie. Deutlicher wird es in Abb. 4.4, welche die Daten nach Normalisierung zeigt. In Abb. 4.5 sieht man beim Vergleich der M-Werte der einzelnen Microarrays untereinander, dass die Mediane der M-Werte eng um den Wert null streuen. Bei den „Ausreißern“ in dieser Abbildung kann es sich zum Teil um die eigentlich relevanten M-Werte handeln, die nach dem späteren Zusammenführen der Daten im *fit* (s. Abb. 4.6) einige der regulierten Gene repräsentieren.

Die normalisierten M- und A-Werte wurden in einem *fit* zusammengefasst (s. Kap. 3.2.6.4.2) und konnten nun, wie in Abb. 4.6 zu sehen, in einem MA-Plot dargestellt werden. Durch dieses Zusammenführen der Daten wurde für jeden Spot ein M-Wert aus den drei biologischen und zwei technischen Wiederholungen ermittelt (aus sechs Einzelwerten wurde ein endgültiger M-Wert). Vergleicht man den *fit* mit den MA-Plots nach Normalisierung oder auch mit den Boxplots der M-Werte (Abb. 4.4 und Abb. 4.5), so fällt auf, dass durch das Mitteln der Daten und das angewendete lineare Modell die Streubreite der M-Werte verringert wird.

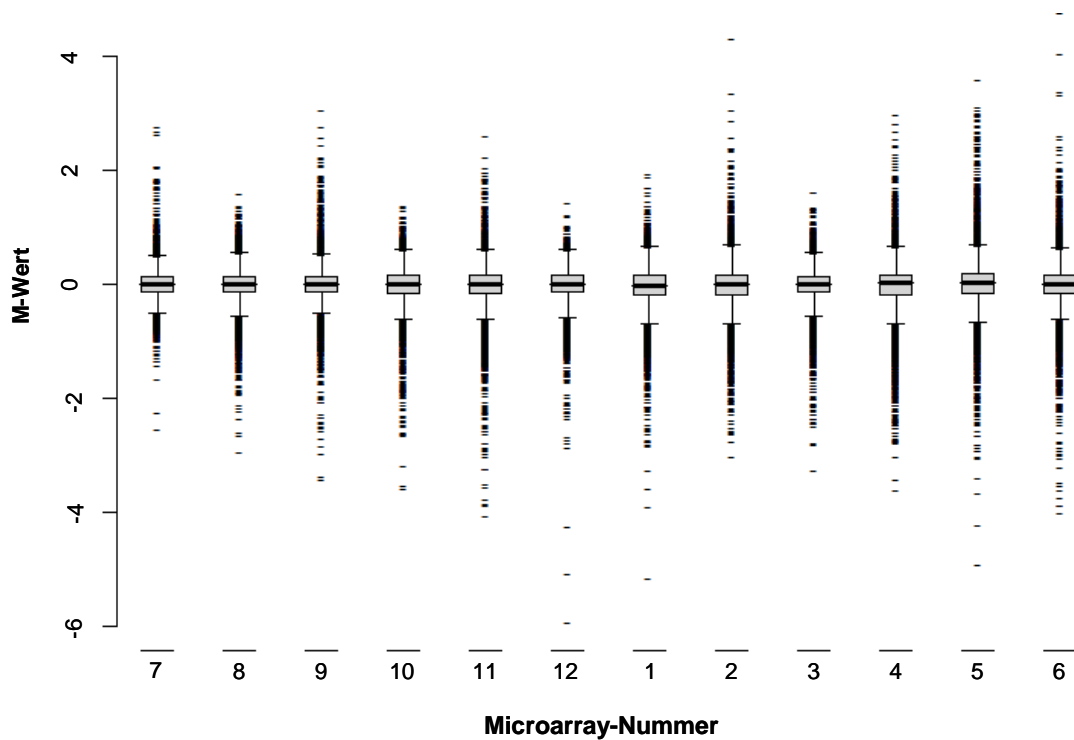


Abb. 4.5 Boxplot-Darstellung der M-Werte aller Microarrays

Jede Spalte zeigt die M-Werte aller Spots eines Arrays, wobei Spalte 7-12 das 3h-Hypoxie-Experiment und Spalte 1-6 das 24h-Hypoxie-Experiment darstellen. Der Median der M-Werte ist durch die horizontale Linie angezeigt, die sich innerhalb des jeweiligen Interquartils (hellgraue Box) befindet. Die Höhe der Box entspricht dem Interquartilsabstand, in dem 50% aller Werte liegen. Die Länge der Whisker (Vertikale ober- und unterhalb der Box) wird durch den 1,5-fachen Interquartilsabstand festgelegt. Werte ober- und unterhalb der Whisker sind „Ausreißer“.

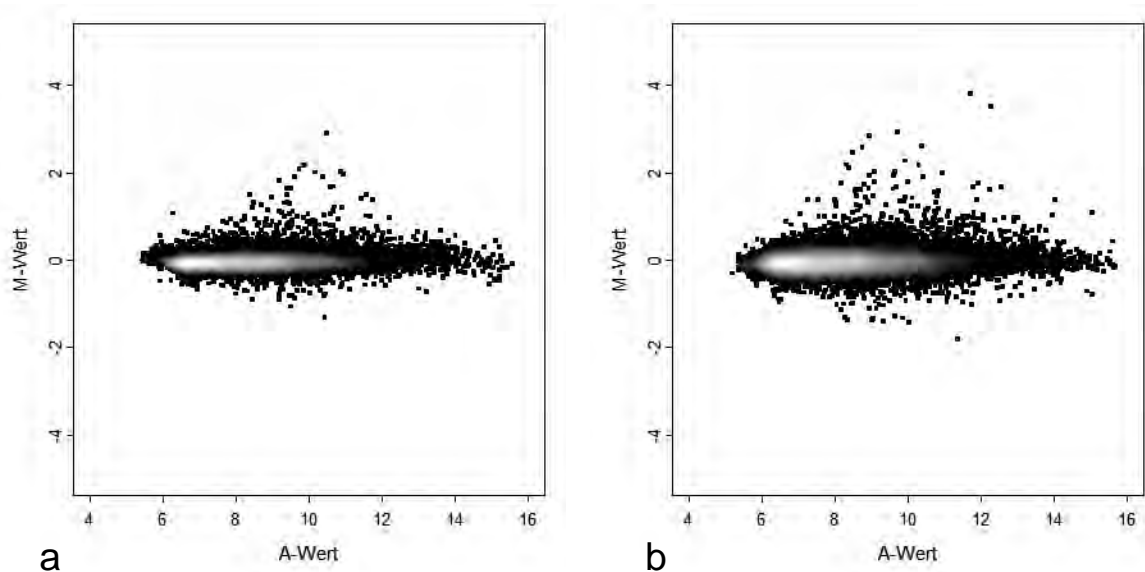


Abb. 4.6 MA-Plot des *fit* der 3h- und 24h-Hypoxie- Experimente nach Normalisierung

Graph **a** zeigt den *fit* der 3h-Hypoxie-Gruppe, Graph **b** den der 24h-Hypoxie-Gruppe.

Schließlich wurde noch der B-Wert (s. Kap. 3.2.6.4.3), welcher die Gene anhand ihrer Wahrscheinlichkeit für eine differentielle Expression ordnet, ermittelt. Abb. 4.7 zeigt eine Auftragung der B- gegen die M-Werte, wobei ein Gen umso wahrscheinlicher differentiell exprimiert ist, je positiver der B-Wert ausfällt. Gene mit B-Werten ≥ 5 wurden als Kandidaten-Gene für weitere Analysen ausgewählt. Auch ist in Abb. 4.7 gut zu sehen, dass mehr Gene nach 24h als nach 3h potentiell reguliert sind.

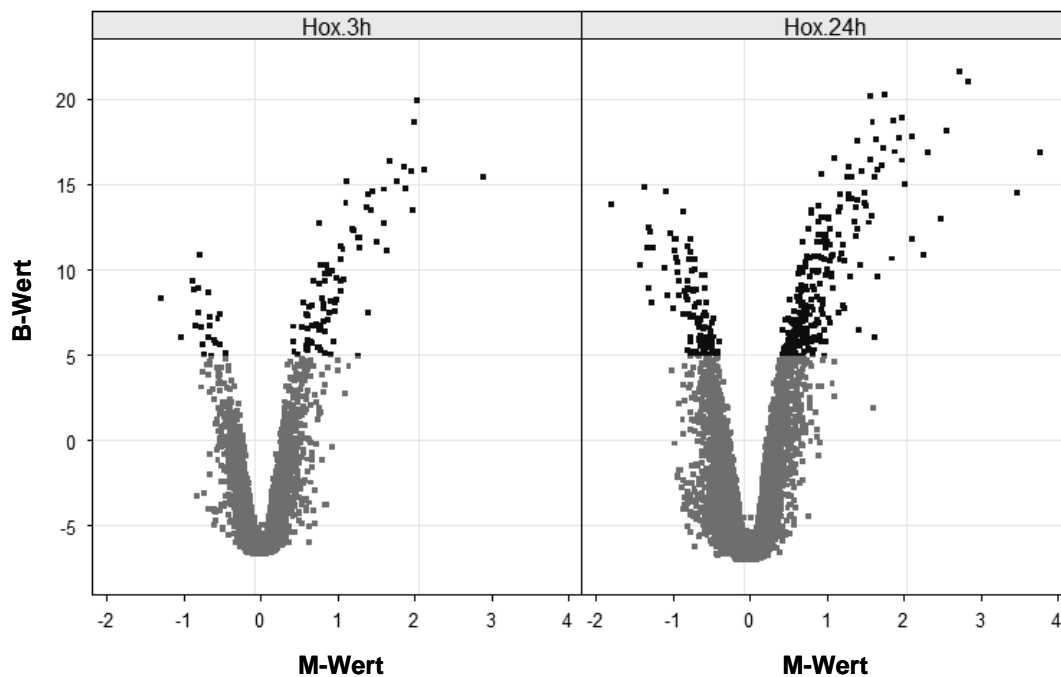


Abb. 4.7 Vulcano Plot der B-Statistik für beide 3h und 24h Hypoxie

Die B-Werte wurden gegen die zugehörigen M-Werte aufgetragen (links 3h Hypoxie, rechts 24h Hypoxie). In beiden Fällen wurde ein B-Wert ≥ 5 (schwarze Punkte) als der Wert festgelegt, ab dem ein Gen als potentiell differentiell exprimiertes Kandidaten-Gen ausgewählt wurde.

4.1.2.1 ANZAHL DER SELEKTIERTEN KANDIDATEN-GENE

In dem durchgeführten Experiment stellte die wenige Stunden andauernde Hypoxie keinen drastischen Eingriff in die Physiologie der Mäuselunge dar, weshalb von nur wenigen regulierten Genen ausgegangen wurde. Daher streuten die meisten M-Werte der exprimiert gefunden Gene um null und waren damit wahrscheinlich nicht differentiell exprimiert. Insgesamt wurden nach den in Kap. 3.2.6.4 festgelegten Kriterien 115 (0.4%) Gene nach 3h und 342 (1%) nach 24h als Kandidaten ausgewählt. Abb. 4.8 zeigt, dass in der 3h-Hypoxie-Gruppe 69% der gefundenen Gene auch nach 24h noch als potentiell reguliert gefunden wurden. Insgesamt wurden jedoch mehr hochregulierte als herabregulierte Gene gefunden, was in Abb. 4.9 gezeigt ist. Nach 3h Hypoxie liegt der Anteil der hochregulierten Kandidaten-Gene bei

76%, nach 24h ist er mit 64% etwas kleiner. Es wurde kein Gen gefunden, welches zum einen der beiden Zeitpunkte hoch- und zum anderen herabreguliert war. Wie man Tab. 4.1 und Tab. 4.2 entnehmen kann, sind die meisten nach 3h hochregulierten Gene auch nach 24h hochreguliert. Vergleicht man jedoch die nach 24h am stärksten hochregulierten Gene mit den regulierten Genen nach 3h, ist ein solcher Zusammenhang nicht erkennbar. Tab. 4.3 und Tab. 4.4 zeigen die am stärksten herabregulierten Kandidaten-Gene.

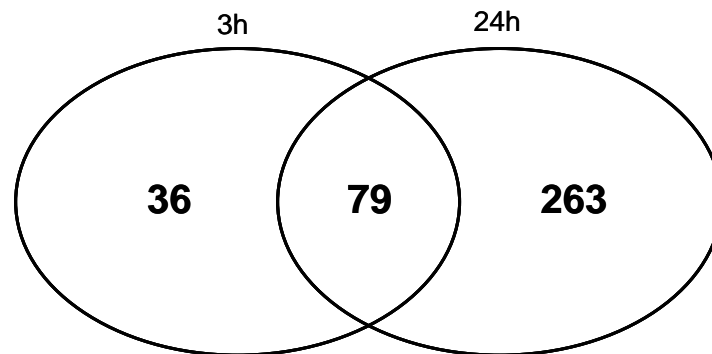


Abb. 4.8 Kandidaten-Gene nach 3h bzw. 24h Hypoxie: Anzahl und Schnittmenge

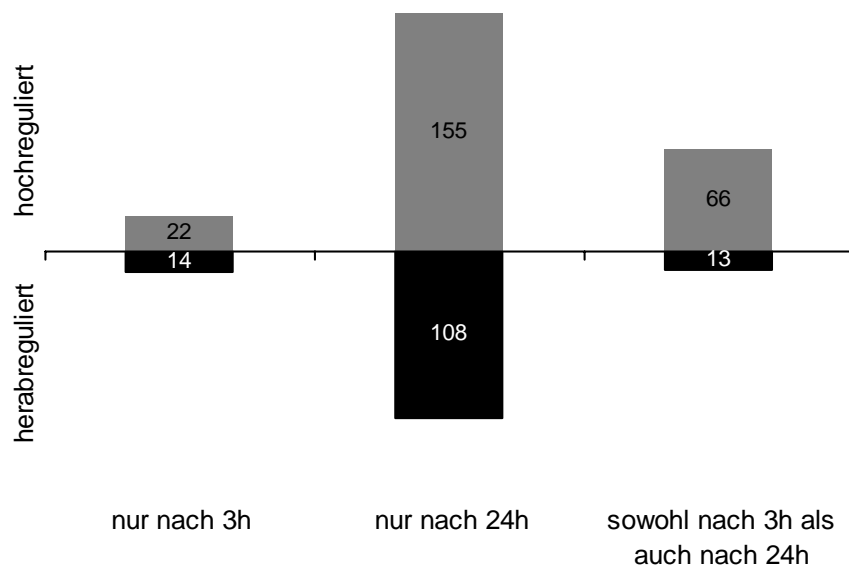


Abb. 4.9 Kandidaten-Gene nach 3h und 24h Hypoxie: Regulationsrichtung

4.1.2.2 VERGLEICH DER DIFFERENTIELLEN EXPRESSIONSPROFILE NACH 3H BZW. 24H HYPOXIE

GenBank Nummer	Genname; offizielles Symbol	3h		24h
		M-Wert	B-Wert	M-Wert
AK002567	metallothionein 2; Mt2	2.98	15.8	2.68
D43775	preproendothelin-1; Edn1	2.33	17.1	1.96
NM_010104	endothelin 1; Edn1	2.24	19.3	1.87
M80263	unnamed (CTGF)	2.09	12.4	1.26
NM_010217	fibroblast inducible secreted protein; Ctgf	2.03	19.6	1.16
NM_013602	metallothionein 1; Mt1	2.01	15.4	1.51
NM_013749	type i transmembrane protein fn14; Fn14-pending	2.00	16.1	1.31
NM_007669	cyclin-dependent kinase inhibitor 1a (p21); Cdkn1a	1.99	14.6	2.15
NM_011580	thrombospondin 1; Thbs1	1.97	14.4	1.37
NM_010220	fk506 binding protein 5 (51 kda); Fkbp5	1.74	12.6	1.77
NM_008046	folliculin; Fst	1.73	14.5	3.17
NM_009760	bcl2/adenovirus e1b 19 kda-interacting protein 1; Bnip3	1.72	17.7	1.90
NM_133662	immediate early response 3; Ier3	1.72	13.2	0.52
NM_016693	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6; Map4k6	1.71	14.5	2.23
AF326555	phosphodiesterase 4b; Pde4b	1.64	15.8	2.23
NM_010728	lysyl oxidase; Lox	1.60	8.5	2.06
AF263239	calcineurin inhibitor (Down syndrom critical regio); Rcan1	1.58	14.9	0.26
NM_010171	coagulation factor iii; F3	1.48	11.8	0.95
ENSMUSG00000042139	ambiguous [source:ensembl_protein]	1.45	7.6	1.66
BC080299	amyotrophic lateral sclerosis 2; Als2cr13	1.45	12.9	0.80
NM_023516	riken cdna 2310016c08; 2310016c08rik	1.43	13.6	0.76
mwgaraccontrol	Arabidopsis Control Oligonucleotide; #008-02	1.43	12.7	1.79
NM_020581	fibrinogen/angiopoietin-related protein; Angptl4	1.39	12.0	1.68
NM_010415	heparin binding epidermal growth factor-like; Hbegf	1.28	13.7	0.10
BC003305	lipoprotein lipase; Lpl	1.28	12.4	0.75
NM_008745	neurotrophic tyrosine kinase; receptor; type 2; Ntrk2	1.27	5.3	2.81
NM_007987	fas antigen; Tnfrsf6	1.25	11.3	1.00
NM_008871	plasminogen activator inhibitor; type i; Serpine1	1.17	8.0	1.58
NM_028803	glucan (1;4-alpha-); branching enzyme 1; Gbe1	1.16	13.0	0.73
NM_023476	lipocalin 7; Lcn7	1.12	12.4	1.55
NM_010516	cysteine rich protein 61; Cyr61	1.12	10.8	-0.16
NM_011332	small inducible cytokine subfamily a17; Scya17	1.12	9.1	1.22
BC011504	unknown (protein for mgc:18918)	1.09	9.7	0.56
NM_011361	serum/glucocorticoid regulated kinase; Sgk	1.06	12.0	1.14
NM_009384	t-cell lymphoma invasion and metastasis 1; Tiam1	1.06	8.6	1.76
NM33670	sulfotransferase; phenol preferring 1; Sult1a1	1.06	8.2	1.43
NM_009743	bcl2-like; Bcl2l	1.06	7.3	1.16
AK003901	cdna clone lipocalin 7; Lcn7	1.06	12.0	1.45
NM_020575	axotrophin; Axot	1.05	5.4	0.45
NM_007679	ccaat/enhancer binding protein (c/ebp); Delta	1.05	11.8	0.73
NM_133753	riken cdna 1300002f13; 1300002f13rik	1.03	10.1	0.95
BC017540	similar to kiaa0721 protein	1.03	7.3	0.77
NM_012006	cytosolic acyl-coa thioesterase 1; Cte1	1.02	10.2	1.13
NM_009705	arginase type ii; Arg2	1.00	9.1	0.43
BC005738	tspy-like 4; Tspy14	0.97	7.2	1.44
NM_008872	plasminogen activator; tissue; Plat	0.97	8.6	1.50
AF205855	serum/glucocorticoid regulated kinase; Sgk	0.96	9.0	0.93
BC005720	serum/glucocorticoid regulated kinase; Sgk1	0.95	9.9	1.01
NM_026268	dual specificity phosphatase 6; Dusp6	0.93	9.2	0.76

Tab. 4.1 Relative Genexpression der 50 am stärksten hochregulierten Kandidaten-Gene nach 3h Hypoxie

Es sind die 50 am stärksten hochregulierten Kandidaten-Gene der 3h-Gruppe, sortiert nach ihrem M-Wert, aufgelistet. Ein fettgedruckter M-Wert in der 24h-Spalte zeigt, dass das Gen auch zu diesem Zeitpunkt als reguliert gefunden wurde. (M- und B-Werte s. Kap. 3.2.6.4).

GenBank Nummer	Genname; offizielles Symbol	24h		3h
		M-Wert	B-Wert	M-Wert
NM_020509	resistin like alpha; Retnla	3.53	13.9	0.31
NM_008046	folliculin; Fst	3.17	21.9	1.73
NM_009252	serine protease inhibitor 2-2; Spi2-2	3.10	21.1	0.91
NM_010471	hippocalcin; Hpca	3.04	12.0	0.20
NM_008745	neurotrophic tyrosine kinase; receptor; type 2; Ntrk2	2.81	14.6	1.27
AK002567	metallothionein 2; Mt2	2.68	18.1	2.98
NM_176840	oxysterol binding protein-like 11; Osbpl11	2.55	14.6	0.08
NM_198164	cell division cycle 2-like 6; Cdc2l6	2.47	16.4	0.70
NM_009665	s-adenosylmethionine decarboxylase 1; Amd1	2.40	13.0	1.22
NM_011260	regenerating islet-derived 3 gamma; Reg3g	2.26	17.4	0.68
NM_001085376	pregnancy associated plasma pro; Pappa2	2.25	9.1	0.19
AF326555	phosphodiesterase 4b; Pde4b	2.23	20.0	1.64
NM_016693	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6; Map4k6	2.23	18.2	1.71
NM_007669	cyclin-dependent kinase inhibitor 1a (p21); Cdkn1a	2.15	16.3	1.99
BC008107	similar to tissue inhibitor of metalloproteinase, Timp-1	2.07	9.6	0.13
NM_010728	lysyl oxidase; Lox	2.06	11.6	1.60
BC019382	metallothionein 2a	2.03	9.3	1.15
D43775	preproendothelin-1; Edn1	1.96	17.7	2.33
BC011217	serine protease inhibitor 2; Serpina3k	1.93	15.3	0.45
NM_009760	bcl2/adenovirus e1b 19 kda-interacting protein 1; Bnip3	1.90	19.8	1.72
NM_010104	endothelin 1; Edn1	1.87	18.6	2.24
NM_011217	protein tyrosine phosphatase; receptor type; r; Ptpn	1.83	16.7	0.86
NM_007739	procollagen; type viii; alpha 1; Col8a1	1.80	19.0	0.11
mwgaracontrol	Arabidopsis Control Oligonucleotide; #008-02	1.79	15.9	1.43
NM_025427	riken cDNA 1190002h23; 1190002h23rik	1.78	15.5	1.49
NM_010220	fk506 binding protein 5 (51 kda); Fkbp5	1.77	13.1	1.74
NM_009384	t-cell lymphoma invasion and metastasis 1; Tiam1	1.76	15.0	1.06
NM_011783	anterior gradient 2 (Xenopus laevis); Agr2	1.69	10.4	0.08
NM_020581	fibrinogen/angiopoietin-related protein; Angptl4	1.68	14.7	1.39
NM_011593	tissue inhibitor of metalloproteinase; Timp	1.67	13.2	0.11
NM_011526	transgelin; Tagln	1.67	19.1	0.76
NM_019662	ras-related associated with diabetes; Rrad	1.67	14.0	0.45
ENSMUSG000000042139	ENSMUST00000035919 ambiguous	1.66	8.9	1.45
AK004880	quiescin Q6; Qscn6	1.66	16.4	0.75
NM_008827	placental growth factor; Pgf	1.65	9.0	0.40
M15832	procollagen, type IV, alpha 1; Col4a1	1.63	16.5	0.34
NM_008871	plasminogen activator inhibitor; type i; Serpine1	1.58	11.4	1.17
NM_023476	lipocalin 7; Lcn7	1.55	16.8	1.12
NM_013602	metallothionein 1; Mt1	1.51	12.6	2.01
NM_008872	plasminogen activator; tissue; Plat	1.50	14.3	0.97
AK003901	cDNA clone lipocalin 7; Lcn7	1.45	16.1	1.06
BC005738	tspy-like 4; Tspyl4	1.44	12.1	0.97
M14042	procollagen, type IV, alpha 1; Col4a1	1.43	14.4	0.33
NM_133670	sulfotransferase; phenol preferring 1; Sult1a1	1.43	12.0	1.06
NM_009150	selenium binding protein 1; Selenbp1	1.43	17.4	0.79
ENSMUSG00000032838	ENSMUST00000048797 unknown	1.43	13.6	0.19
AK007441	homolog to c8orf4 protein; 1810011O10Rik	1.42	15.0	0.88
ENSMUSG00000036668	ENSMUST00000036659 unknown	1.41	12.1	0.02
X69832	serine peptidase inhibitor, clade A, member 3M; Serpina3m	1.40	9.2	0.12
NM_011580	thrombospondin 1; Thbs1	1.37	10.2	1.97

Tab. 4.2 Relative Genexpression der 50 am stärksten hochregulierten Kandidaten-Gene nach 24h Hypoxie

Erläuterung s. Tab. 4.1

GenBank Nummer	Genname; offizielles Symbol	3h		24h
		M-Wert	B-Wert	M-Wert
NM_016974	d site albumin promoter binding protein; Dbp	-1.39	8.1	-1.61
NM_009236	sry-box containing gene 18; Sox18	-1.07	8.8	-0.55
NM_009911	chemokine (c-x-c) receptor 4; Cmkar4	-1.04	12.2	-1.59
NM_016873	wnt1 inducible signaling pathway protein 2; Wisp2	-1.02	9.5	0.18
NM_008620	macrophage activation 2; Mpa2	-0.98	7.0	-0.69
AF001229	putative adrenomedullin receptor	-0.95	7.8	-1.09
AF263458	onzin, placenta-specific 8; Plac8	-0.92	6.7	-1.47
AK012678	data source:sptr; source key; Q9qzc2	-0.89	8.8	-0.54
BC002065	serine peptidase inhibitor, clade A, member 3G; Serpina3	-0.86	10.0	-0.80
ENSMUSG00000029298	ENSMUST00000031235 macrophage activation 2; Mpa2	-0.83	7.9	-0.84
NM_009425	tnf-related apoptosis inducing ligand; Tnfsf10	-0.83	6.1	-0.96
NM_133244	membrane bound factor; Mbf-pending	-0.82	10.4	0.08
ENSMUSG00000033391	interferon induced guanylate binding; LOC229901	-0.79	5.8	-0.82
ENSMUSG00000037846	e74-like factor 2; Elf2	-0.78	6.3	-0.06
NM_011545	transcription factor 21; tcf21; Pod 1	-0.75	5.3	-0.01
NM_023653	wingless-related mmtv integration site 2; Wnt2	-0.74	7.7	-0.52
NM_008250	h2.0-like homeo box gene; Hlx	-0.74	7.7	-0.62
NM_009238	sry-box containing gene 4; Sox4	-0.73	7.3	-0.90
NM_023502	e74-like factor 2; Elf2	-0.70	5.7	-0.13
NM_010426	forkhead box f1a; Foxf1a	-0.68	5.8	-0.15

Tab. 4.3 Relative Genexpression der 20 am stärksten herabregulierten Kandidaten-Gene nach 3h Hypoxie

Erläuterung s. Tab. 4.1

GenBank Nummer	Genname; offizielles Symbol	24h		3h
		M-Wert	B-Wert	M-Wert
NM_032398	plasmalemma vesicle associated protein; Plvap	-1.92	12.4	-0.20
NM_016974	d site albumin promoter binding protein; Dbp	-1.61	10.7	-1.39
NM_009911	chemokine (c-x-c) receptor 4; Cmkar4	-1.59	17.7	-1.04
ENSMUSG00000023132	granzyme A; Gzma	-1.59	12.5	-0.61
U72644	leukocyte specific transcript 1; Lst1	-1.54	10.3	-0.44
AF263458	onzin, placenta-specific 8; Plac8	-1.47	12.9	-0.92
AK020314	cystatin domain containing protein; MCST E2	-1.46	12.2	-0.05
NM_010370	granzyme a; Gzma	-1.46	10.6	-0.51
NM_011784	angiotensin receptor-like 1; Agrl1	-1.41	8.3	-0.87
NM_009127	stearoyl-coenzyme a desaturase 1; Scd1	-1.39	7.4	-0.03
NM_053078	neuronal protein 3.1; d0h4s114	-1.26	11.1	-0.46
NM_021718	lymphocyte antigen 116; Ly116	-1.20	10.7	-0.35
NM_010704	leptin receptor; Lepr	-1.19	11.9	-0.05
AK020485	homolog to hgt-d-p (fwp001); 9430073N08Rik	-1.18	9.5	-0.44
NM_009381	thyroid hormone responsive SPOT14 homolog; Thrsp	-1.14	7.3	-0.06
BC026627	similar to dkfzp586l2024 protein	-1.10	12.6	-0.09
AK007905	GH regulated TBC protein 1; Grtp1	-1.09	12.4	-0.49
AF001229	putative adrenomedullin receptor	-1.09	9.7	-0.95
ENSMUSG00000029878	DNA binding protein with his-thr domain; Dbpht2	-1.07	8.0	-0.29
ENSMUSG00000038771	ENSMUST00000037192 plasminogen activator inhibitor	-1.07	5.9	-0.02

Tab. 4.4 Relative Genexpression der 20 am stärksten herabregulierten Kandidaten-Gene nach 24h Hypoxie

Erläuterung s. Tab. 4.1

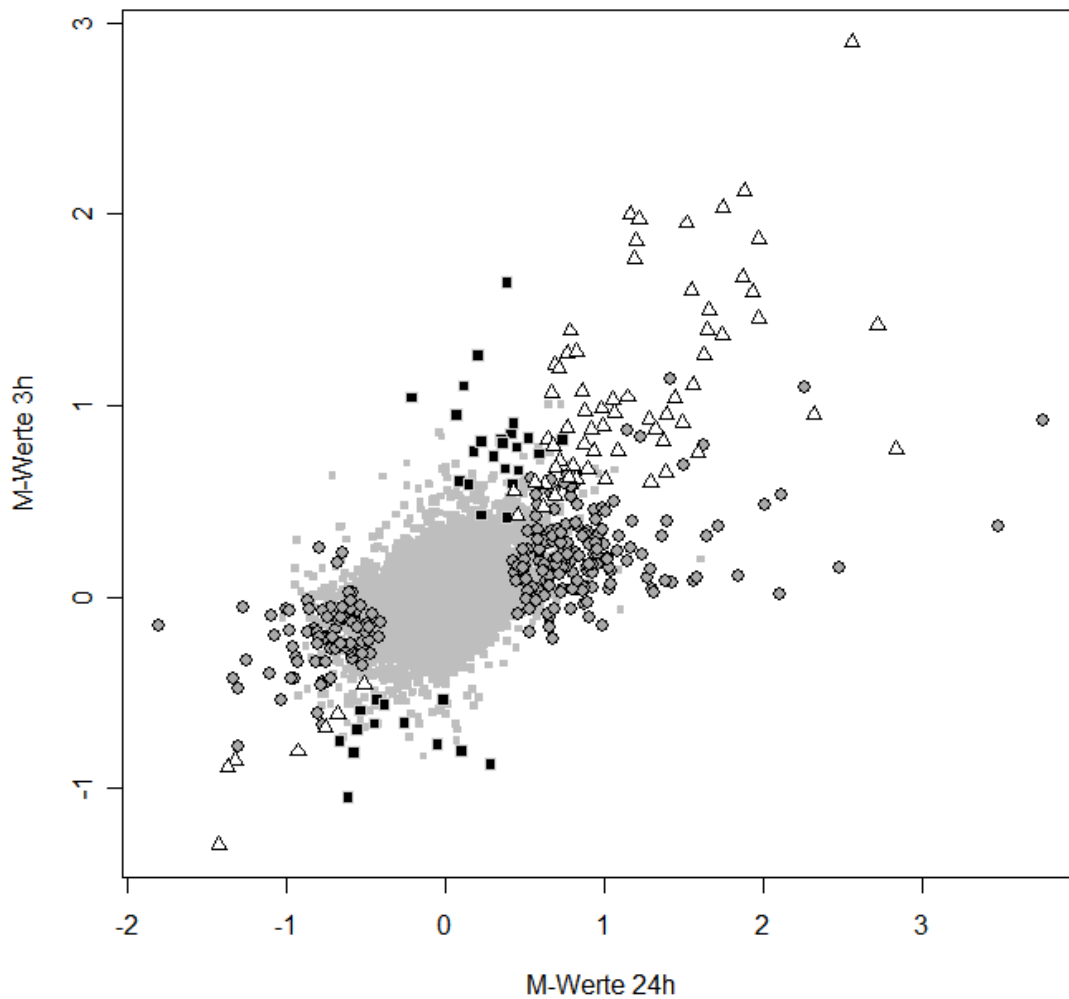


Abb. 4.10 Vergleich der nach 3h als reguliert gefundenen Kandidaten-Gene mit denen nach 24h

Gezeigt ist die Korrelation der M-Werte. (Δ) zeigt ein zu beiden Zeitpunkten, (\bullet) ein nur nach 24h Hypoxie, (\blacksquare) ein nur nach 3h Hypoxie reguliert gefundenes Kandidaten-Gen. (\blacksquare) zeigt Gene, welche zu beiden Zeitpunkten als nicht reguliert gefunden wurden.

4.1.2.3 ÜBERPRÜFUNG AUSGEWÄHLTER KANDIDATEN-GENE AUF *HYPOXIA RESPONSIVE ELEMENTS* (HRE)

Jeweils 55 als reguliert gefundene Gene der beiden Zeitpunkte nach 3h und 24h Hypoxie wurden auf das Vorhandensein möglicher *Hypoxia Responsive Elements* (HRE) überprüft (s. Kap. 1.2). Hierzu wurde von der für jedes Gen kodierenden Sequenz ausgehend die DNA 5000bp aufsteigend sowie absteigend auf die Nukleotidfolge „ACGTGS“ (wobei S für ein G oder C steht) überprüft. In der Literatur wird diese Sequenz von Camenisch *et al.* beschrieben^[12]. Es wurde sowohl der codierende Strang in 5′- 3′ Richtung als auch der Gegenstrang in 3′- 5′ Richtung sowie im jeweilig auf- und absteigenden Strang untersucht (s. Abb. 4.11). Die HRE-

Konsensus-Sequenz wurde in der 24h-Gruppe bei 52 von 55 untersuchten Genen gefunden. In der 3h-Gruppe waren es bei 55 Genen 53. In jede Gruppe wurden 45 hochregulierte und 10 herabregulierte Gene einbezogen. Es fanden sich bis zu neun HREs pro Gen, wobei durchschnittlich drei HREs gefunden wurden. Eine schematische Darstellung über die Verteilung der HREs im jeweilig überprüften DNA-Abschnitt ist in der Abb. 4.11 und Abb. 4.12, anhand einer Auswahl der am stärksten regulierten Gene zu sehen. Es zeigte sich bezüglich der Anzahl oder der Verteilung der HRSs kein Unterschied zwischen den hochregulierten und herabregulierten Kandidaten-Genen. In Tab. 4.5 sind bekannte, HIF1 regulierte Gene dargestellt. Hier konnte die Hälfte dieser Gene zu mindestens einem Zeitpunkt der Hypoxie als reguliert gefunden werden.

GenBank Nummer	Genname; offizielles Symbol	3h		24h	
		M-Wert	B-Wert	M-Wert	B-Wert
NM_009627	adrenomedullin; Adm	0.42	-2.7	0.14	-6.5
NM_007438	aldolase 1; a isoform; Aldo1	0.25	-2.4	0.59	6.7
NM_009760	bcl2/adenovirus e1b 19 kda-interacting protein 1; Bnip3	1.72	17.7	1.90	19.8
AK020809	cdna clone homolog to nitric oxide synthase; Nos	0.13	-5.6	0.27	-4.6
NM_007752	ceruloplasmin; Cp	0.07	-6.3	0.96	11.0
NM_010104	endothelin 1; Edn1	2.24	19.3	1.87	18.6
NM_023119	enolase-1; Eno1	-0.14	-4.9	0.12	-5.5
AF312033	erythropoietin; Epo	-0.31	-5.1	-0.08	-5.8
M23384	glucose transporter 1; Glut1	0.22	-5.9	0.19	-6.4
NM_008084	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Gapdh	0.05	-6.6	0.28	-3.5
NM_010442	heme oxygenase 1; Hmox1	-0.03	-6.7	0.16	-6.2
NM_008341	insulin-like growth factor binding protein 1; Igfbp1	0.21	-5.9	0.04	-7.0
NM_008343	insulin-like growth factor binding protein 3; Igfbp3	0.04	-6.6	-0.46	4.4
NM_008344	insulin-like growth factor binding protein 6; Igfbp6	0.13	-5.5	0.61	5.1
NM_010699	lactate dehydrogenase 1; Ldh1	0.67	8.5	0.85	13.2
NM_008826	phosphofructokinase; liver; b-type; Pfk1	0.49	1.3	0.57	2.7
NM_008828	phosphoglycerate kinase 1; Pgk1	0.43	1.5	0.40	1.0
NM_008871	plasminogen activator inhibitor, serpine1; Pais	1.17	8.0	1.58	11.4
D43775	preproendothelin-1; Edn1	2.33	17.1	1.96	17.7
AJ314858	prolyl 4-hydroxylase alpha iia subunit; P4ha2	0.19	-4.3	0.83	8.4
BC005509	similar to lactate dehydrogenase a; Ldha	0.64	7.7	0.75	9.7
AF440692	transferrin; Tf	0.20	-5.0	0.90	8.0
NM_011638	transferrin receptor; Trfr	-0.19	-5.4	0.05	-6.9
NM_009506	vascular endothelial growth factor c; Vegfc	0.26	-1.9	1.22	15.0
NM_009367	transforming growth factor; beta 2; Tgfb2	0.24	-3.3	0.64	5.3

Tab. 4.5 Bekannte Zielgene von HIF1 (modifiziert nach Ke *et al.* und Semenza)^[36,77]

Fettgedruckte Gene wurden nach mindestens einem Zeitpunkt als reguliert gefunden (s. jeweils fettgedruckten M-Wert). Die restlichen Gene sind nicht als reguliert gefunden worden. (M- und B-Werte s. Kap. 3.2.6.4).

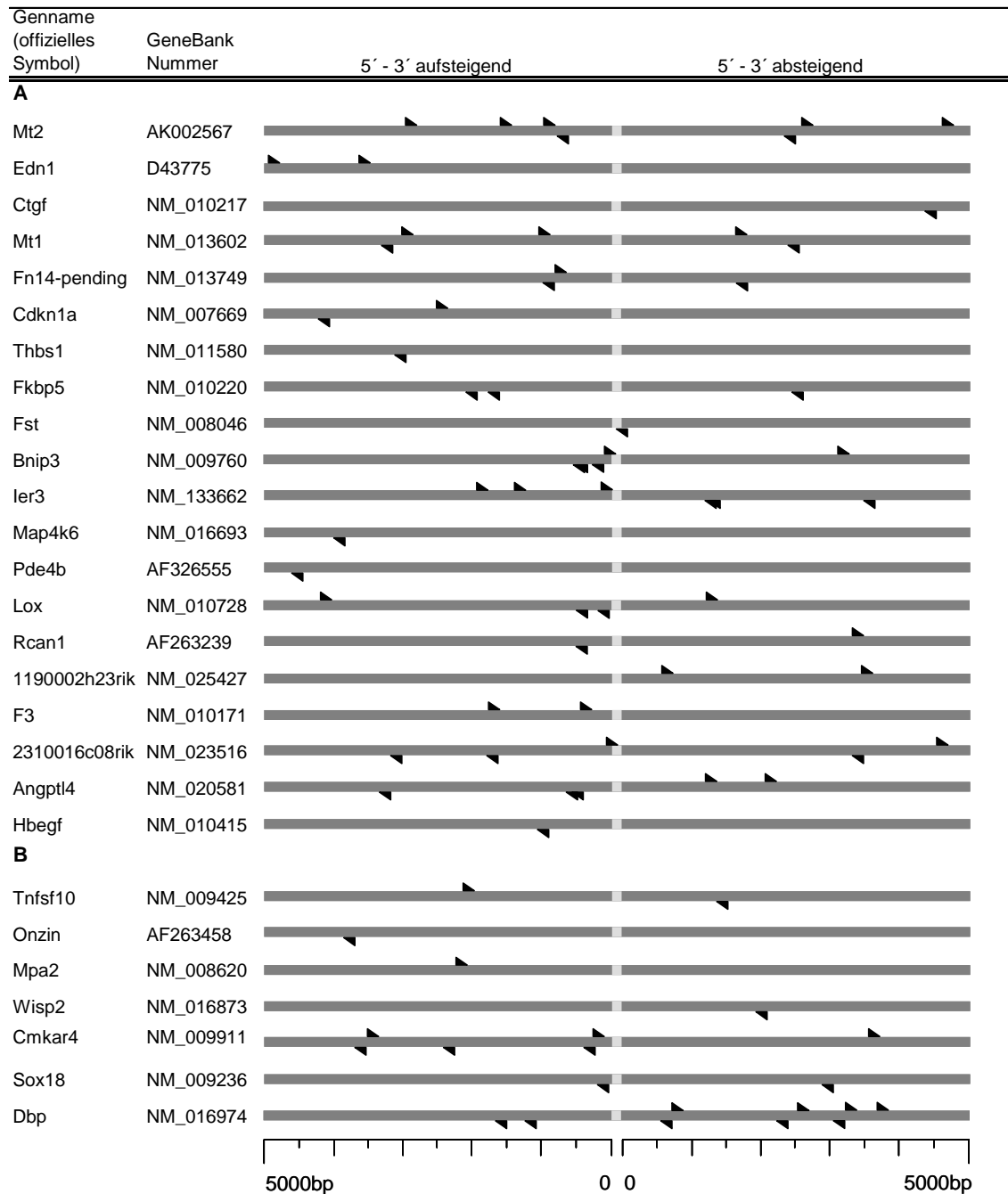


Abb. 4.11 Auswahl reguliert gefundener Kandidaten-Gene mit den jeweiligen *Hypoxia Responsive Elements* in der 3h-Hypoxie-Gruppe

5000bp auf- und absteigend von der für das Gen kodierenden Sequenz (hellgraues Kästchen) wurde die Konsensus-Nukleotidsequenz „ACGTGS“ schematisch mit einem schwarzen Dreieck markiert. Dreiecke, welche oben auf dem dargestellten DNA-Strang liegen, zeigen HREs im kodierenden Strang, solche die unterhalb liegen im Gegenstrang. Unter **A** ist eine Auswahl aus den am stärksten hochregulierten und unter **B** aus den am stärksten herabregulierten Kandidaten-Gene zu sehen.

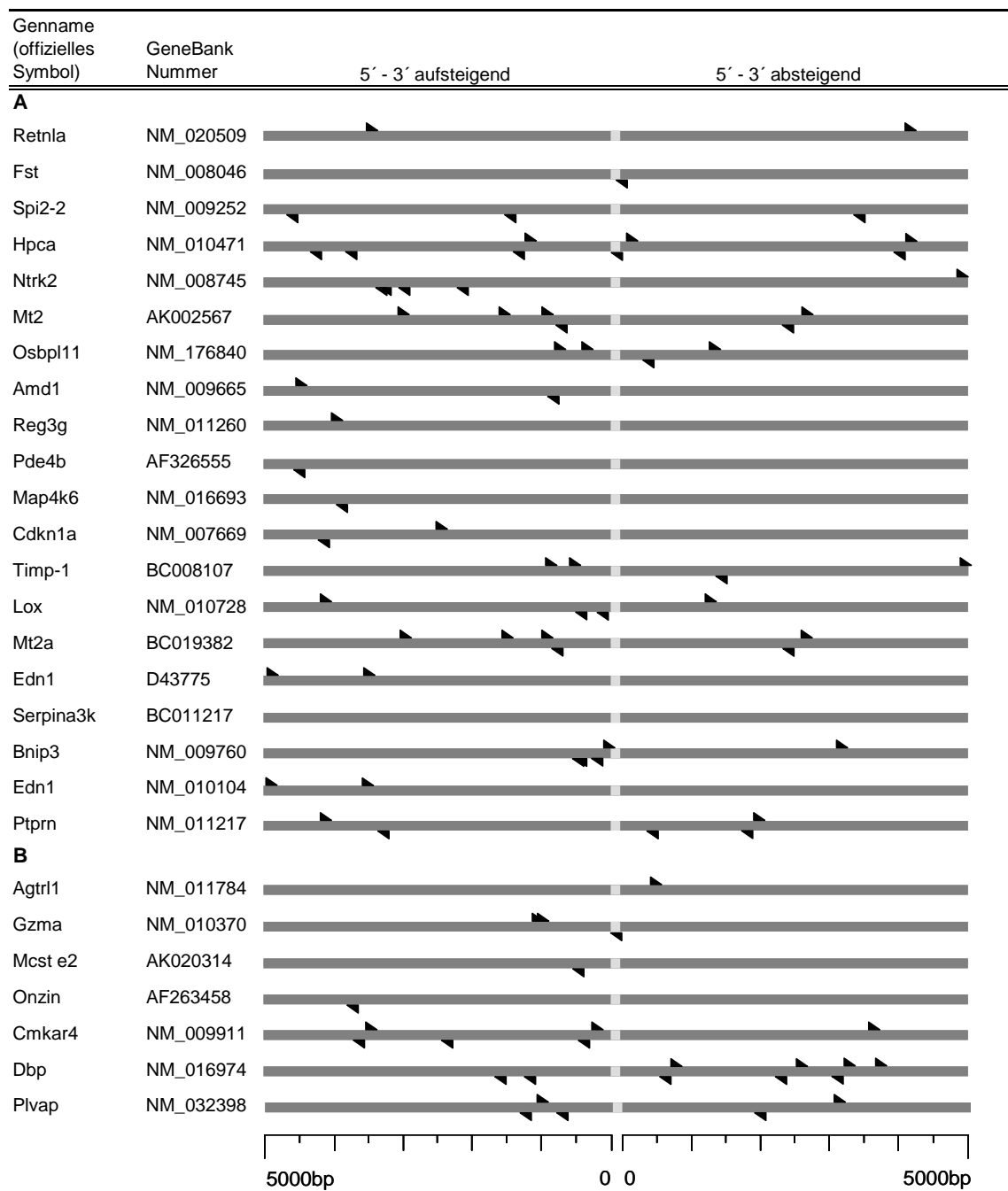


Abb. 4.12 Auswahl reguliert gefundener Kandidaten-Gene mit den jeweiligen *Hypoxia Responsive Elements* in der 24h-Hypoxie-Gruppe

5000bp auf- und absteigend von der für das Gen kodierenden Sequenz (hellgraues Kästchen) wurde die Konsensus-Nukleotidsequenz „ACGTGS“ schematisch mit einem schwarzen Dreieck markiert. Dreiecke, welche oben auf dem dargestellten DNA-Strang liegen, zeigen HREs im kodierenden Strang, solche die unterhalb liegen im Gegenstrang. Unter **A** ist eine Auswahl aus den am stärksten hochregulierten und unter **B** aus den am stärksten herabregulierten Kandidaten-Gene zu sehen.

4.1.2.4 EINFLUSS DER KANDIDATEN-GENE AUF ZELLULÄRE SIGNALWEGE

Mittels der Software Pathway-Express wurden die als reguliert gefundenen Kandidaten-Gene bezüglich ihres Einflusses auf biologische Signalwege überprüft. Grundlage hierfür war die KEGG-Datenbank. In Tab. 4.6 und Tab. 4.7 sind die Signalwege aufgelistet, welche durch die regulierten Gene zu beiden Zeitpunkten der Hypoxie beeinflusst werden. Der *impact factor* schätzt die biologische Relevanz, welche den regulierten Genen im jeweiligen Signalweg beigemessen wird und ist in Kap. 3.2.6.4.4 näher erläutert. Nach 3h Hypoxie waren 16, nach 24h 19 Signalwege involviert. Der Zellzyklus-Signalweg wurde beispielsweise nur nach 3h Hypoxie als signifikant beeinflusst gefunden. Die Signalwege für MAP-Kinase-, fokale Adhäsion-, Cytokin-Cytokin-Rezeptor-Interaktion und TGF-beta wurden zu beiden Zeitpunkten mit, verglichen mit den übrigen Signalwegen, hohem *impact factor* gefunden. Nach 24h Hypoxie war vor allem der Signalweg der Antigenpräsentation beeinflusst. Aber auch die Signalkaskaden der Interaktion mit Rezeptoren der extrazellulären Matrix sowie des Auf- und Umbaus des Zytoskeletts fanden sich erst nach 24h.

Signalweg- Nummer	Name des KEGG-Signalwegs	<i>impact factor</i>	Anzahl in den Signalweg involvierter Gene	Anzahl im Signalweg gefundener Gene	p-Wert
mmu04010	MAPK signaling pathway	13.4	253	7	1.1E-05
mmu04350	TGF-beta signaling pathway	9.6	84	2	2.6E-02
mmu04916	Melanogenesis	9.2	97	2	3.4E-02
mmu04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	8.6	240	5	7.5E-04
mmu04510	Focal adhesion	8.1	190	3	1.9E-02
mmu04110	Cell cycle	7.2	109	3	4.2E-03
mmu05214	Glioma	6.1	65	2	1.6E-02
mmu05218	Melanoma	6.0	71	2	1.9E-02
mmu00920	Sulfur metabolism	6.0	11	1	3.2E-02
mmu04012	ErbB signaling pathway	6.0	87	2	2.8E-02
mmu05215	Prostate cancer	5.7	84	2	2.6E-02
mmu04610	Complement and coagulation cascades	5.5	71	2	1.9E-02
mmu05220	Chronic myeloid leukemia	5.3	77	2	2.2E-02
mmu03320	PPAR signaling pathway	5.1	78	2	2.3E-02
mmu04670	Leukocyte transendothelial migration	4.3	117	2	4.7E-02
mmu05030	Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	4.0	17	1	4.9E-02

Tab. 4.6 Durch 3h Hypoxie beeinflusste KEGG-Signalwege

Anzahl und Einfluss (*impact factor*) der nach 3h Hypoxie reguliert gefundenen Kandidaten-Gene auf Signalwege der KEGG-Datenbank.

Signalweg- Nummer	Name des KEGG-Signalwegs	<i>impact factor</i>	Anzahl in den Signalweg involvierter Gene	Anzahl im Signalweg gefundener Gene	p-Wert
mmu04612	Antigen processing and presentation	46.3	82	4	4.5E-03
mmu04510	Focal adhesion	20.0	190	12	5.6E-08
mmu04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	17.5	240	13	9.5E-08
mmu04010	MAPK signaling pathway	12.4	253	10	4.5E-05
mmu04350	TGF-beta signaling pathway	11.8	84	3	3.1E-02
mmu04512	ECM-receptor interaction	11.3	84	6	6.4E-05
mmu05211	Renal cell carcinoma	9.4	69	5	2.5E-04
mmu05212	Pancreatic cancer	9.2	73	5	3.2E-04
mmu04810	Regulation of actin cytoskeleton	7.9	201	6	6.1E-03
mmu04610	Complement and coagulation cascades	7.4	71	4	2.7E-03
mmu00980	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	6.4	71	3	2.0E-02
mmu04514	Cell adhesion molecules (CAMs)	6.3	144	5	6.5E-03
mmu04150	mTOR signaling pathway	5.8	52	3	8.7E-03
mmu05220	Chronic myeloid leukemia	5.3	77	3	2.5E-02
mmu05010	Alzheimer's disease	5.2	23	2	1.5E-02
mmu04940	Type I diabetes mellitus	5.0	60	3	1.3E-02
mmu03320	PPAR signaling pathway	4.9	78	3	2.6E-02
mmu01510	Neurodegenerative Disorders	4.8	28	2	2.2E-02
mmu00940	Coumarine and phenylpropanoid biosynthesis	3.9	5	1	4.0E-02

Tab. 4.7 Durch 24h Hypoxie beeinflusste KEGG-Signalwege

Erläuterung s. Tab. 4.6

4.1.2.5 MOLEKULARE FUNKTION DER KANDIDATEN-GENE

Für jedes Gen, welches signifikant reguliert war, wurde eine Einteilung bezüglich seiner molekularen Funktion durchgeführt. Anhand der GenBank *accession number* der Gene erfolgte mit Hilfe der Software AmiGO für Gen-Ontologie (GO) eine Einteilung in die verschiedenen Gruppen für molekulare Funktion und Aktivität der Gene. Von möglichen 19 GO-Hauptgruppen mit jeweils zahlreichen Untergruppen zeigte sich nach der Analyse, dass lediglich acht Hauptgruppen unter den Kandidaten-Genen zu finden waren. Diese sind im Folgenden aufgelistet, wobei die jeweils gefundenen Untergruppen in Klammern aufgeführt sind.

- Bindung; GO-Nummer: 0005488 (Antigenbindung, Kohlenhydratbindung, Ionenbindung, Fettsäurenbindung, Nukleinsäurebindung, Nukleotidbindung, Proteinbindung, Seleniumbindung)
- Katalyse; GO-Nummer: 0003824 (Hydrolaseaktivität, Oxidoreduktaseaktivität, Transferaseaktivität)
- Enzymmodulation; GO-Nummer: 0030234 (enzyminhibitorisch, GTPase-regulierend)
- Signalübertragung; GO-Nummer: 0060089
- strukturmolekulare Aktivität; GO-Nummer: 0005198 (extrazelluläre Struktur, Strukturbestandteil des Zytoskeletts)
- Transkriptionsfaktoren; GO-Nummer: 0030528
- Transporter; GO-Nummer: 0005215 (transmembrane Transporter-Aktivität, substratspezifische Transporter-Aktivität)
- Molekulare Funktion unbekannt

In Abb. 4.13 sind die prozentualen Verteilungen der Gene zu den jeweiligen Gruppen anhand von Kreisdiagrammen dargestellt. Abb. 4.13 zeigt die als hochreguliert und herabreguliert gefundenen Kandidaten-Gene zu den Zeitpunkten nach 3h und 24h Hypoxie. Es gab keinen nennenswerten Unterschied zwischen den beiden Zeitpunkten beim Vergleich der hochregulierten Gene. Der Vergleich der herabregulierten Gene ist aufgrund des relativ hohen Anteils unbekannter molekularer Funktionen und der niedrigen Anzahl an Genen (27) in der 3h-Gruppe erschwert. Es sind jedoch im Gegensatz zu den hochregulierten Kandidaten-Genen die Gruppen der Transkriptionsfaktoren und der Signalübertragung hervorzuheben, welche bei den hochregulierten Kandidaten-Genen nur eine untergeordnete Rolle spielen.

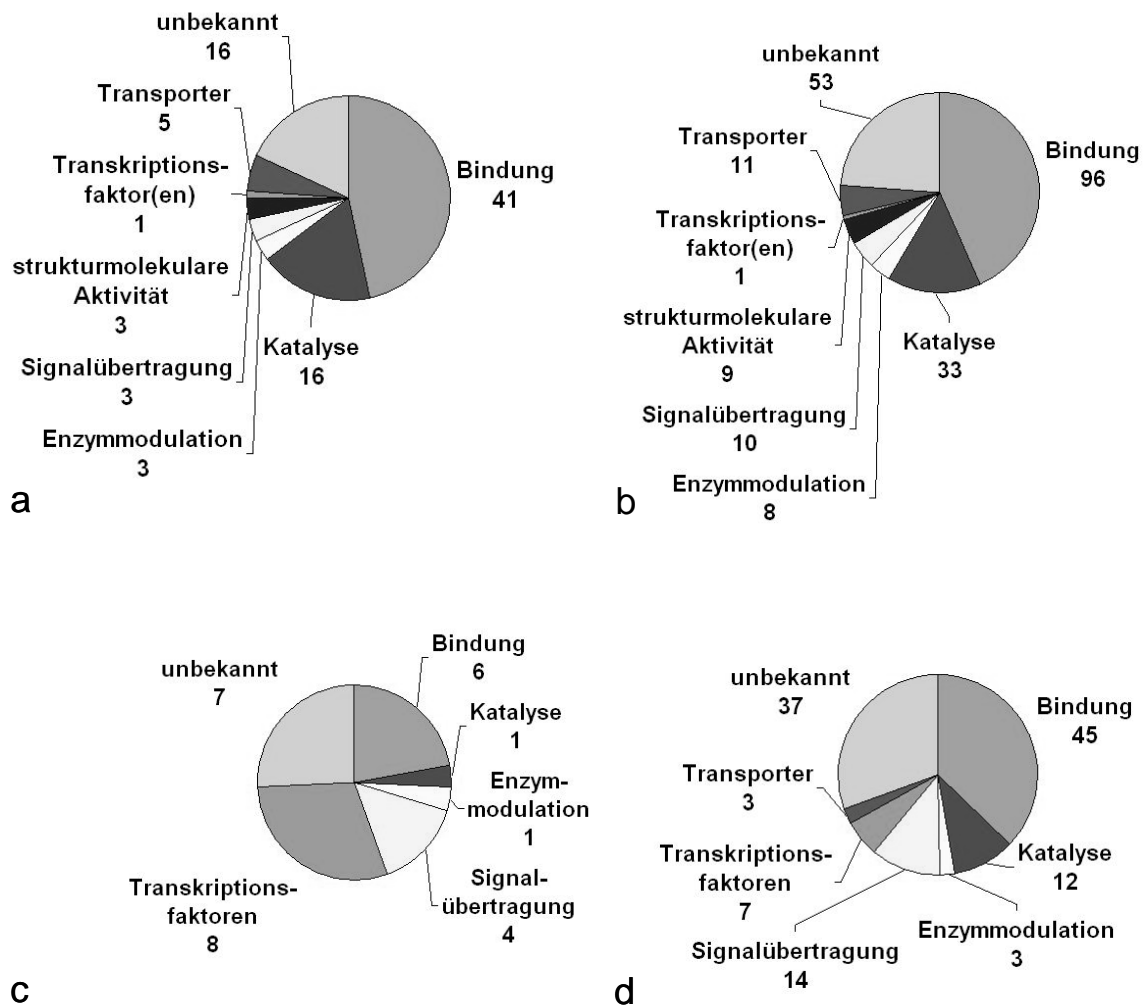


Abb. 4.13 Verteilung der hoch- und herabregulierten Kandidaten-Gene hinsichtlich ihrer Funktion

a) zeigt die Anzahl der nach 3h und **b)** der nach 24h Hypoxie hochreguliert; **c)** zeigt die Anzahl der nach 3h und **d)** der nach 24h herabreguliert gefundenen Kandidaten-Gene, sortiert nach ihrer molekularen Funktion und Aktivität basierend auf der Gendatenbank AmiGO für Gen-Ontologie.

4.2 Vergleich der Agilent-Microarray-Daten mit denen von MWG-Microarrays

Microarrays der Firma MWG (s. Kap. 3.2.6 und Kap. 4.1.2) werden im Folgenden mit solchen von Agilent Technologies verglichen. Hierfür wurde das Material der Pools aus dem 24h-Vergleich auf die Agilent-Microarrays hybridisiert. Mit zwei Arrays wurde ein *dye-swap*-Experiment durchgeführt, welches dann mit den Ergebnissen der Testreihe der MWG-Oligo-Microarrays verglichen werden konnte (s. Abb. 4.14). Im Unterschied zu MWG-Arrays, bei denen fluoreszenzmarkierte cDNAs verwendet wurden, kam bei den Agilent-Arrays fluoreszenzmarkierte cRNA zum Einsatz (s. Kap. 3.2.5). cDNA ist stabiler als RNA, jedoch erlaubt bei der Verwendung von cRNA ein durchgeführter Amplifikationsschritt geringere Ausgangsmengen an mRNA für ein Microarray-Experiment.

GenBank Nummer	Genname; offizielles Symbol	24h	
		M-Wert	B-Wert
NM_008745	neurotrophic tyrosine kinase; receptor; type 2; Ntrk2	3.69	-1.4
NM_008046	folliculin; Fst	3.07	-1.4
NM_020509	resistin like alpha; Retnla	2.89	-1.4
NM_009252	serine protease inhibitor 2-2; Spi2-2	2.48	-1.5
NM_134102	phosphatidylserine-specific phospholipase A1; Pspla1	2.44	-1.5
AK002567	metallothionein 2; Mt2	2.43	-1.5
AK007630	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; P21	2.40	-1.5
NM_009384	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1; Tiam1	2.31	-1.6
NM_011260	regenerating islet-derived 3 gamma; Reg3g	2.22	-1.5
NM_009665	S-adenosylmethionine decarboxylase 1; Amd1	2.20	-1.7
NM_010728	lysyl oxidase; Lox	2.11	-1.6
NM_019840	phosphodiesterase 4B; Pde4b	2.07	-1.6
NM_007739	procollagen, type VIII, alpha 1; Col8a1	2.05	-1.8
NM_008871	plasminogen activator inhibitor type 1; Serpine1	2.01	-1.6
NM_010104	endothelin 1; Edn1	1.93	-1.6
NM_053085	transcription factor 23; Tcf23	1.91	-2.1
NM_016693	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6; Map3k6	1.87	-1.9
NM_031168	interleukin 6; Il6	1.87	-2.5

Tab. 4.8 Relative Genexpression der am stärksten hochregulierten Kandidaten-Gene nach 24h Hypoxie der Agilent-Microarrays

Gezeigt ist eine Auswahl der am stärksten hochregulierten Kandidaten-Gene der 24h-Gruppe der Agilent-Microarrays, sortiert nach ihrem M-Wert. (M- und B-Werte s. Kap. 3.2.6.4).

Da mit den Agilent-Microarrays nur ein *dye-swap*-Experiment durchgeführt wurde, erfolgten nicht genügend Wiederholungen für eine aussagefähige statistische Auswertung. Deutlich wird dies bei der Betrachtung der B-Werte, welche alle kleiner als Null waren und somit weit unter dem für das Experiment gewählten statistischen Einschlusskriterium $B \geq 5$ lagen (s. Kap. 3.2.6.4.3 und Tab. 4.8). Dennoch weisen die

M-Werte auf eine Regulation zahlreicher Gene hin. Die fehlende statistische Sicherheit muss jedoch bei den folgenden Vergleichen bedacht werden.

Anhand der GeneBank Nummer der Gene konnten zwischen beiden Formaten 10.500 Gene gefunden werden, welche die gleiche GeneBank Nummer besaßen und somit für einen Vergleich der M-Werte geeignet waren. Anhand der Abb. 4.14 wird deutlich, dass es ein hohes Maß an Übereinstimmung hinsichtlich der Ergebnisse gibt. Der Korrelationskoeffizient der ungefilterten Daten (s. Abb. 4.14 **a**) liegt bei 0.67, das Bestimmtheitsmaß (r^2) damit bei 0.45. Bei ausschließlicher Berücksichtigung der bei MWG reguliert gefundenen Gene liegen die Werte sogar bei 0.88 bzw. 0.78 (s. Abb. 4.14 **b**).

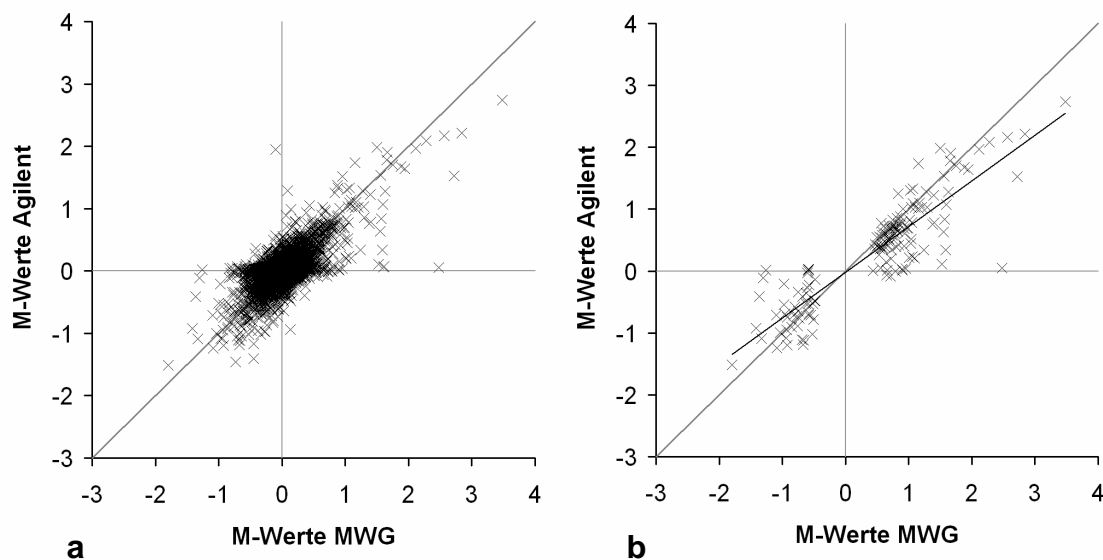


Abb. 4.14 Vergleich der Agilent- mit den MWG-Microarrays, bezogen auf die M-Werte

Die Winkelhalbierende zeigt jeweils die theoretisch ideale Korrelation beider Datensätze. **a**) zeigt die Korrelation aller Gene, **b**) zeigt nur die bei den MWG-Arrays als reguliert gefundenen Gene.

4.3 Bestätigung der Ergebnisse durch real-time-PCR

Im Vorfeld der real-time-PCR wurde die Effizienz (ϵ) der Primer getestet. Ziel war es Primer zu konstruieren, welche mit ihrer Effizienz nahe 2.0 lagen (s. Kap. 3.2.7.6). Dies traf, wie in Tab. 4.9 gezeigt wird, auf die meisten Primer zu. Neben der Effizienzbestimmung wurde mittels einer Agarose-Gelelektrophorese eine weitere Qualitätsüberprüfung durchgeführt (s. Kap. 3.2.3.2 und Kap. 3.2.7.4). Abb. 4.15 stellt für verschiedene Ausgangsverdünnungen die Amplifikationsprodukte dar. Für alle verwendeten Primersysteme fand sich ein PCR-Produkt mit erwarteter Länge. In Spalte 5 ist die Negativkontrolle aufgetragen, die mögliche Kontamination anzeigt.

GeneBank Nummer	Genname; offizielles Symbol	Effizienz (ε)
NM_001024388	porphobilinogendeaminase; Pbgd	1.94
AF440692	transferrin; Trf	2.02
NM_008046	folliculin; Fst	1.92
NM_010220	fk506 binding protein 5; Fkbp5	2.00
AF326555	phosphodiesterase 4b; Pde4b	1.97
NM_133662	immediate early response 3; Ier3	1.90
NM_009760	bcl2/adenovirus e1b 19 kda-interacting protein 1; Bnip3	1.84
NM_016974	d site albumin promoter binding protein; Dbp	1.53
NM_008827	placental growth factor; Pgf	1.47
NM_016693	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6; Map4k6	1.82
NM_011580	thrombospondin 1; Thbs1	2.06
NM_019466	down syndrome critical region protein 1; Dscr1	1.91
NM_013867	breast cancer anti-estrogen resistance 3; Bcar3	1.89
NM_013602	metallothionein 1; Mt1	2.03

Tab. 4.9 Effizienz (ε) der verwendeten Primer für die real-time-PCR

Die in Kap. 3.2.7.4 erläuterte Schmelzkurvenanalyse wurde immer zur qualitativen Überprüfung der Primer durchgeführt. Die im Anschluss an die real-time-PCR ermittelten Schmelzpunkte der jeweiligen Amplifikate lagen zwischen 75.7°C (*Bnip*) und 84.8°C (*Map4k6*). Diese Ergebnisse deckten sich im Mittel auf 0.5°C genau mit den zuvor durch die Software Primer Express PPC errechneten Schmelzpunkten.

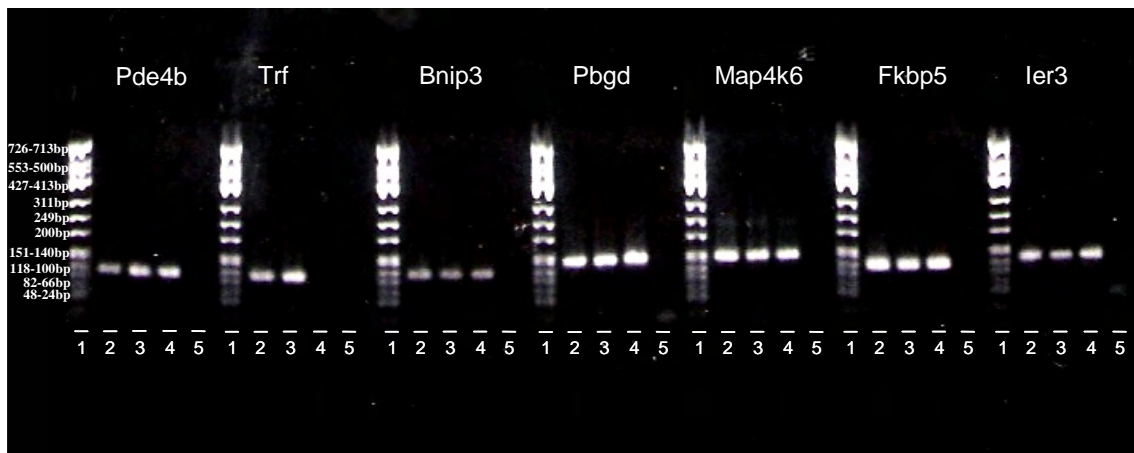


Abb. 4.15 Nachweis der Produktspezifität der Primer mittels Gelelektrophorese

Der Genname ist jeweils als offizielles Symbol angegeben. **1** zeigt immer die Markerbanden des Längenstandards *Hinfl*. Die amplifizierten Proben wurden wie folgt aufgetragen: **2** = normoxische Probe [1:10], **3** = hypoxische Probe [1:10], **4** = hypoxische Probe [1:100]. Spalte **5** Pufferkontrolle; hier würden mögliche Primerdimere erkennbar sein, da hier die Reaktion ohne Zugabe von cDNA durchgeführt wird. Bei *Trf* fehlt die hypoxische Probe [1:100]. [] = cDNA-Verdünnung vor Amplifikation.

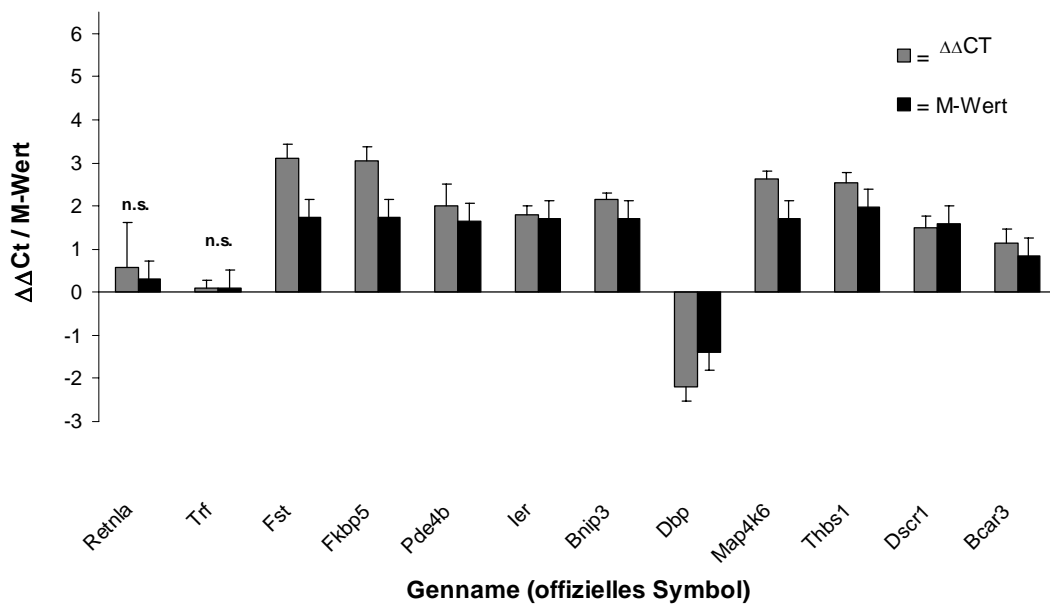


Abb. 4.16 Vergleich der $\Delta\Delta C_t$ -Werte aus der real-time-PCR mit den M-Werten der Microarray-Experimente der 3h-Hypoxie-Gruppe an ausgewählten Genen

Gezeigt sind neun hochregulierte und zwei nicht regulierte Gene (*Retnla*, *Trf*) der 3h-Hypoxie-Gruppe sowie ein herabreguliertes Gen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des $\Delta\Delta C_t$ -Werts bzw. des M-Werts an. (Definition $\Delta\Delta C_t$ -Wert bzw. M-Wert s. Kap. 3.2.6.4.3 und 3.2.7.3)

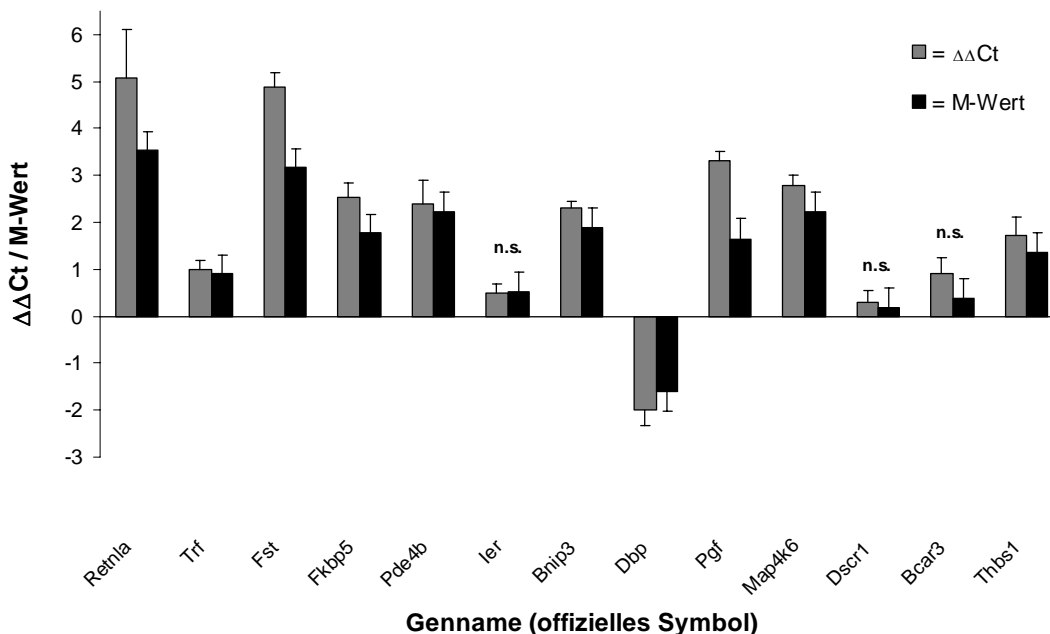


Abb. 4.17 Vergleich der $\Delta\Delta C_t$ -Werte mit den M-Werten des Microarray-Experiments der 24h-Hypoxie-Gruppe an ausgewählten Genen

Gezeigt sind neun hochregulierte und drei nicht regulierte Gene (*Ier*, *Dscr1*, *Bcar3*) der 24h-Hypoxie-Gruppe sowie ein herabreguliertes Kandidaten-Gen. Weiteres s. Abb. 4.16.

Um die Microarray-Ergebnisse mit einer zweiten, unabhängigen Methode zu validieren, wurde für die real-time-PCR das Material aus denselben Pools verwendet, wie es auch für die Microarray-Experimente genutzt wurde (s. Kap. 3.2.2.1). Die mRNA aus jedem der sechs Pools pro Zeitpunkt (je drei Pools der hypoxischen und normoxischen Gruppe) wurde in cDNA transkribiert (s. Kap. 3.2.7.1) und in die real-time-PCR eingesetzt. Eine Standardisierung erfolgte auf die Referenzgene *Pbgd* und *Hprt1* (s. Kap. 3.2.7.3). Die anschließend ermittelten Expressionsprofile, dargestellt als $\Delta\Delta C_T$ -Werte, sind in Abb. 4.16 und Abb. 4.17 zu sehen und werden hier direkt mit dem M-Wert aus dem Microarray-Experiment des jeweiligen Gens verglichen (zur real-time-PCR, Standardisierung und relativen Quantifizierung s. Kap. 3.2.7).

Aus Abb. 4.16 und Abb. 4.17 wird ersichtlich, dass die Expressionstendenzen der Microarray-Analyse mit denen der real-time-PCR übereinstimmen. Auch die Ergebnisse der Gene *Retnla* und *Trf*, welche nach 3h Hypoxie nicht reguliert gefunden wurden, jedoch nach 24h reguliert waren, konnten bestätigt werden. Umgekehrt gilt dies auch für die Gene *Ier*, *Dscr1* und *Bcar3*, welche nach 3h Hypoxie als reguliert gefunden wurden.

Für jedes zu überprüfende Gen wurde in jedem PCR-Lauf eine Negativkontrolle mitgeführt (s. Kap. 3.2.7.2). Die Zyklusdifferenz zwischen den untersuchten Proben und den Negativkontrollen lag bei mindestens zehn.

4.4 Lokalisation der Proteine ausgewählter Kandidaten-Gene

Die Genprodukte (= Proteine) von *Bcar3* und *Retnla* wurden im Lungengewebe der Maus mittels immunhistochemischer Markierung lokalisiert (s. Kap. 3.2.8). Die Immunhistochemie sollte zudem Hinweise auf eine eventuell schon durch diese Methode sichtbare Regulation auf Proteinebene ermöglichen. *Bcar3* konnte nur im Bronchialepithel nachgewiesen werden (s. Abb. 4.18). Abb. 4.19 zeigt den immunhistochemischen Nachweis von *Retnla* sowohl in glatten Muskelzellen der Arterie als auch in Septumanteilen. Abb. 4.20 zeigt immunhistochemische Negativkontrollen von Mauslungengewebe. Bei beiden Proteinen ließ sich keine Regulation nachweisen, sodass hier nur die Bilder nach 24h Normoxie gezeigt sind.

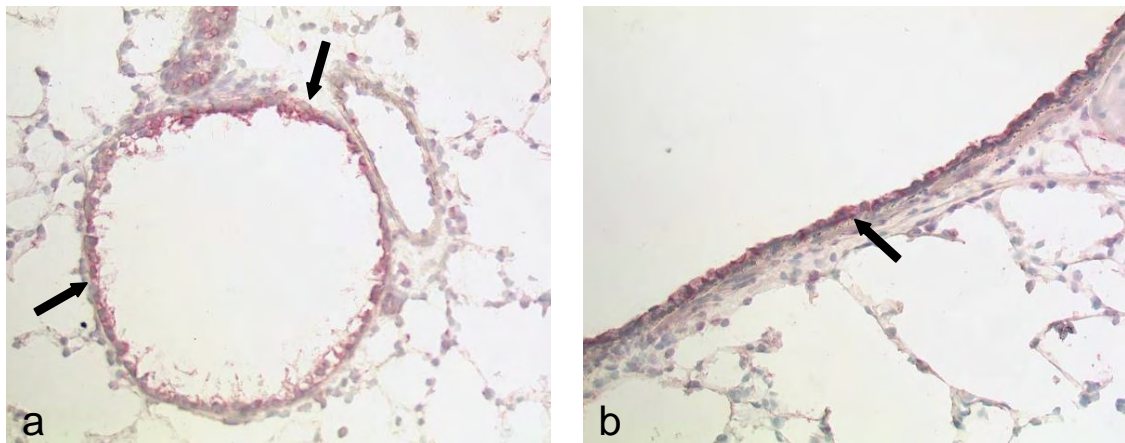


Abb. 4.18 Immunhistochemische Darstellung von Bcar3 in der Mauslung

Bild **a** zeigt Bronchus und Septum in 200-facher Vergrößerung, Bild **b** einen Ausschnitt von **a** in 400-facher Vergrößerung. Nachweis von Bcar3 im Bronchusepithel (➡).

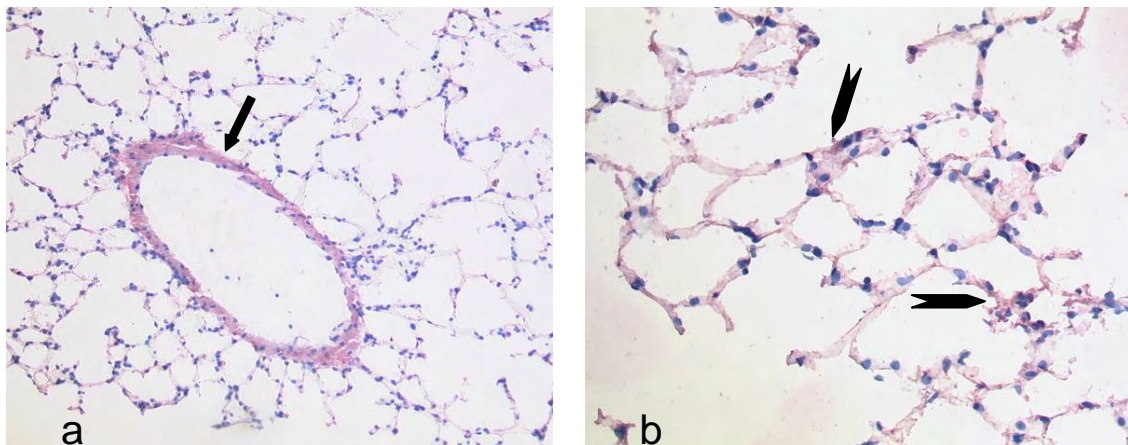


Abb. 4.19 Immunhistochemische Darstellung von Retnla in der Mauslung

Bild **a** zeigt Arterie und Septum in 200-facher Vergrößerung, Bild **b** einen Ausschnitt von **a** in 400-facher Vergrößerung. Nachweis von Retnla in der Arterienmedia und somit in glatten Muskelzellen (➡); sowie in Septumanteilen in **b** (➡).

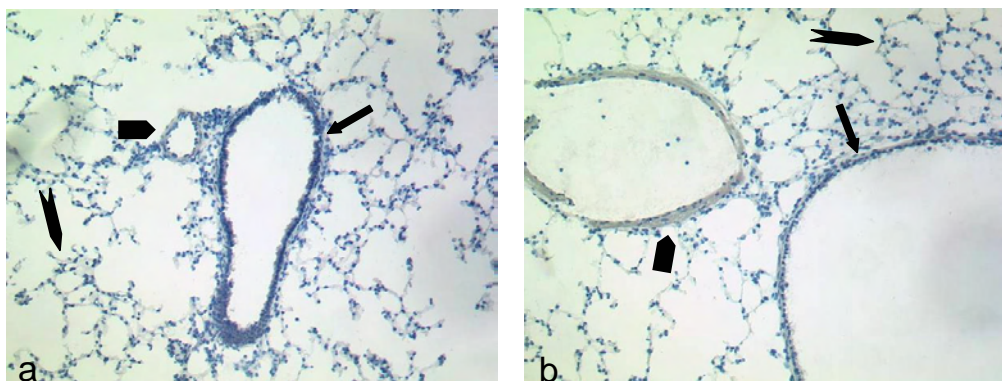


Abb. 4.20 Negativkontrollen der immunhistochemischen Untersuchungen

a und **b** zeigen Negativkontrollen verschiedener Anteile von Mauslungengewebe. (Substitution des Primärantikörpers durch Puffer) Bronchus (➡); Arterie (➡); Septum (➡)

5 Diskussion

5.1 Methoden-basierte Diskussion

5.1.1 DAS MICROARRAY-EXPERIMENT

Um komplexe und funktionale Mechanismen in der Zelle verstehen zu können, bedarf es einer genauen Analyse von parallel und global ablaufenden Prozessen auf transkriptionaler Ebene. Microarrays sind zum Synonym für diese Art von Experimenten geworden, da sie diese komplexen Vorgänge untersuchen und somit die Grundlage für das Erreichen des Zieles darstellen^[11,33]. Sie erlauben die simultane Bestimmung der Expression einer Vielzahl von Genen innerhalb eines einzigen Experimentes und ermöglichen so eine umfassende Momentaufnahme des Transkriptoms in einem definierten physiologischen, pathologischen oder zu ergründenden Zustand^[73].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Expressionsprofil von Genen aus Lungenhomogenat von Mäusen, die unter hypoxischen vs. normoxischen Bedingungen gehalten wurden, mit Hilfe von cDNA-Microarrays untersucht. Für alle Proben wurde ein *dye-swap*-Experiment durchgeführt (s. Kap. 3.2.6). Diese Technik wird empfohlen, um unterschiedliche Intensitäten und eventuelle genspezifische Präferenzen der beiden Farbstoffe auszuschließen^[18,37]. Der direkte Vergleich von Kontrollgruppe und behandelter Gruppe auf ein und demselben Array erhöht die Aussagekraft bezüglich des Unterschiedes in der Genexpression^[6]. Ein Nachteil des *dye-swap*-Experiments liegt in den hierdurch entstehenden Kosten durch Material und Arbeitsaufwand. Dies wurde jedoch aufgrund der oben genannten Vorteile in Kauf genommen. Die Kombination aus biologischen Wiederholungen und dem Bilden von Pools aus der RNA verschiedener Tiere (s. Kap. 3.2.6), erhöht ebenfalls die Aussagekraft und Generalisierbarkeit des Experiments^[6]. Bei Einzelmessungen könnten mögliche Variationen in der physiologischen Genexpression oder auch pathophysiologische Veränderungen durch erkrankte Individuen die Messung verfälschen. Diese Effekte können durch das Bilden von Pools minimiert werden. Nachteilig ist jedoch, dass dadurch mehr Tiere für die Versuche benötigt werden. Die Anzahl der benötigten Tiere ergab sich somit aus der Tatsache, dass man validere Ergebnisse mit einer höheren Anzahl biologischer Proben, nicht aber mit mehr technischen Wiederholungen erreichen kann^[13].

Da es sich bei Microarray-Experimenten auch unter optimalen Bedingungen um ein Experiment mit relativ hoher Variabilität zwischen den einzelnen Arrays handelt^[6], wird allgemein eine Kombination aus biologischer und technischer Wiederholung empfohlen. Deutlich wird dies, wenn man die *fits* aus allen biologischen und technischen Wiederholungen in Abb. 4.6 mit Abb. 4.4 und Abb. 4.5 vergleicht. Vor dem Zusammenführen der Daten streuten die M-Werte wesentlich stärker. Zur Überprüfung möglicher Ungenauigkeiten (z.B. auf Microarrays basierende Fehler), ist es wichtig, die Ergebnisse mit alternativen Methoden zu verifizieren^[41]. Um die Expression ausgewählter Gene mit den Microarray-Ergebnissen zu vergleichen, wurde die bei Genexpressions-Messungen oft als Goldstandard bezeichnete real-time-PCR genutzt^[11,80]. Die eigens hierfür konstruierten Primer wurden vor den Experimenten mittels verschiedener Methoden qualitativ überprüft (s. Kap. 3.2.7 und Kap. 4.3). Die Expressionstendenzen der Microarray-Analyse deckten sich, wie in Kap. 4.3 beschrieben, gut mit denen der real-time-PCR. Auffallend ist, dass die aus der PCR stammenden Regulationsfaktoren zum größten Teil höher sind als die des Microarray-Experiments. In der Literatur wird von Bosotti *et al.* die dynamische Reichweite der PCR als sehr groß beschrieben, was eine mögliche Begründung dieses Effekts sein könnte. Weiterhin ist bei Microarrays das Hintergrundrauschen größer als bei der PCR^[11,80]. Die kleineren ermittelten Faktoren bei den Microarray-Experimenten schmälern jedoch keineswegs die Ergebnisse. Man muss zwar einerseits berücksichtigen, dass nicht jedes einzelne regulierte Gen zu finden ist (abhängig von der jeweiligen statistischen Herangehensweise), andererseits hat man den großen Vorteil, mehrere tausend Gene gleichzeitig auf ihre Regulation überprüfen zu können. Dies wiederum ist mit der PCR aus zeitlichen und finanziellen Gründen kaum möglich.

Im Rahmen der Wahl einer geeigneten Plattform für die Microarray-Experimente ergab sich die Möglichkeit, eine Versuchsreihe in einem Testlabor der Firma Agilent durchzuführen. Die Unterschiede zwischen den eigentlich für diese Arbeit verwendeten MWG- und Agilent-Microarrays bestehen zum einen in der Länge der verwendeten Oligonukleotide (MWG 50mer; Agilent 60mer), zum anderen werden die MWG-Oligonukleotide mittels einer dünnen Nadel auf die Oberfläche aufgebracht, wohingegen sie bei Agilent ähnlich der Tinte eines Tintenstrahldruckers „aufgespritzt“ werden. Allgemein kann man bei Oligonukleotiden davon ausgehen, dass die verwendeten Gensequenzen sehr spezifisch für das jeweilige Gen sind. Dies ist dadurch zu erklären, dass Sequenzen, die Homologien zu anderen Genen zeigen, vom Design der Oligonukleotide weitgehend ausgeschlossen werden. Kreuz-Hybridisierungen sollen hierdurch vermieden werden. Bei der Firma MWG wurde hierzu die Software Oligos4Arrays benutzt, die die Sequenzen durch BLAST und

Smith-Waterman-Analyse abgleicht und sich hierzu der Datengrundlage der UniGene Datenbank bedient^[5,7,83]. Ein weiterer Unterschied zwischen Agilent- und MWG-Microarrays liegt in der Art und Weise, wie das zu untersuchende Material fluoreszenzmarkiert und später hybridisiert wird (s. Kap. 3.2.6.1.1 und Kap. 3.2.6.1.2). Im Rahmen der Fluoreszenzmarkierung für Agilent-Microarrays wurde das eingesetzte Material präamplifiziert. Diese Methode wird vor allem bei kleinen Ausgangsmengen von RNA (beispielsweise nach Mikrodisektion) benötigt, um genügend Material für das Microarray-Experiment zu erhalten^[109].

Da in den letzten Jahren Microarrays mit langkettigen Oligonukleotiden einen großen Stellenwert unter den DNA-Microarrays eingenommen haben, war es interessant, diese beiden Plattformen vergleichen zu können^[65]. Da das *dye-swap*-Experiment mit Agilent-Microarrays jedoch nicht mit genügend technischen und biologischen Wiederholungen erfolgen konnte, ließ sich der Versuch nicht sinnvoll statistisch auswerten (s. Kap. 4.2). Trotzdem wurde anhand der Daten beider Plattformen ein Vergleich durchgeführt, welcher, wie in Kap. 4.2 dargestellt, ein hohes Maß an Übereinstimmung ergab. Insgesamt lag der Korrelationskoeffizient der als reguliert gefundenen Kandidaten-Gene bei 0.88 (s. Abb. 4.14). Dieses Ergebnis stützt die Aussage von Hoheisel *et al.*, nach welcher die Microarray-Technologie einen ausreichenden qualitativen Standard erreicht hat, um Expressionsprofile von Genen innerhalb und zwischen verschiedenen Plattformen vergleichen zu können^[33,65].

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich im Anschluss an ein Microarray-Experiment gute Möglichkeiten bieten, Hypothesen zu generieren und weitere, konkretere Untersuchungen durchzuführen. Dies kann, wie in dieser Arbeit gezeigt, die Analyse verschiedener Signalwege sein (s. Kap. 5.3.2), aber auch die nähere Untersuchung eines oder mehrerer Gene bzw. der von diesen codierten Proteine (s. Kap. 4.4).

5.1.2 AUSSAGEWERT VON MICROARRAY-DATEN AUS LUNGEN-HOMOGENAT

Hypoxie führte bei den untersuchten Mäuselungen zu einer veränderten Genexpression (s. Kap. 4.1.2.2). Zu beiden Zeitpunkten der Hypoxie (3 und 24h) zeigten sich mehr hoch- als herabregulierte Kandidaten-Gene. Durch die Identifikation von Genen, die während beider untersuchter Zeitpunkte als reguliert eingestuft wurden, kann nur bedingt auf die tatsächlich ablaufenden, komplexen biologischen Prozesse in der Lunge und vor allem in den einzelnen Zellen geschlossen werden.

Dennoch lassen sich, wie Kap. 5.3 zeigt, bereits nach 3h sowie noch deutlicher nach 24h Hypoxie beachtliche Zusammenhänge aus den Expressionsprofilen der Gene erkennen.

Es lässt sich aufgrund der Verwendung von Homogenat aus Lungengewebe nicht klar zuordnen, welcher Gewebetyp im Einzelnen für die gefundene Regulation eines Genes verantwortlich ist. Dennoch wurde für das Experiment Homogenat benutzt, da so ein guter Überblick über die global ablaufenden Prozesse in der Lunge gewonnen werden konnte. Expressionsprofile aus einzelnen Zelltypen, welche beispielsweise durch FACS (fluorescence-activated cell sorter) oder Laser-assistiertes Zellpicking ermittelt werden könnten, würden sich ohne den Vergleich mit den Profilen aus Homogenat schwerer interpretieren lassen. Um später ein reguliertes Kandidaten-Gen trotz Homogenat bestimmten Zellarten zuzuordnen, bietet sich die Immunhistochemie an. Diese Methode wurde, wie in Kap. 4.4 gezeigt, auch in unserer Studie angewandt.

Zellen, die für das veränderte Expressionsprofil aus Lungenhomogenat in Frage kommen, sind in erster Linie Endothelzellen, glatte Muskelzellen der Lungenarterien und Arteriolen sowie adventitielle Fibroblasten^[88]. Weiterhin können glatte Muskelzellen und das Epithel des Bronchialbaums bis hin zu den Lungenalveolarwänden beteiligt sein. Eine prozentuale Verteilung der verschiedenen Zellen der Alveolarwand ist im Folgenden gezeigt^[50].

1. 8% Alveolarepithelzellen Typ I (sehr flache Zellen, die 95% der Alveolaroberfläche ausmachen und dem Gasaustausch dienen)
2. 16% Alveolarepithelzellen Typ II (Reduktion der Oberflächenspannung in den Alveolen durch Surfactant Produktion)
3. 30% Kapillarendothelzellen
4. 36% Interstitielle Zellen wie Fibroblasten, Lymphozyten und Mastzellen
5. 10% Alveolarmakrophagen

Fink *et al.* haben beim Vergleich von Mauslungenhomogenat mit mikrodisssezierten Lungenarterien mittels cDNA-Nylonarrays nur eine geringe Übereinstimmung zwischen beiden Expressionsprofilen gefunden^[28]. Es stellt sich somit die Frage, ob hoch- oder herabregulierte Kandidaten-Gene im Bronchialepithel oder dem Endothel der Lungengefäße nach einer so kurzen Zeit unter Hypoxie im Lungenhomogenat überhaupt erkennbar sind. Dafür spricht, dass in den gerade genannten Zellarten unter chronischer Hypoxie die gravierendsten Veränderungen in der Lunge in Form von irreversiblen Umbauprozessen ablaufen^[43]. Somit kann man annehmen, dass auch bei kurzzeitiger Hypoxie hier die ersten Reaktionen auf die veränderte

Umgebung zu finden sind. Als Beispiel dafür kann man das Gen *Bcar3* nennen (s. Kap. 4.3 und Kap. 4.4). Das zugehörige Protein konnte mittels Immunhistochemie nur im Bronchialepithel lokalisiert werden (s. Abb. 4.18). Trotzdem fand sich im 3h-Hypoxie-Experiment eine Hochregulation der Genexpression (M-Wert 0.84; $\Delta\Delta C_T$ -Wert 1.13). Auch das Gen des Transkriptionsfaktors *Nfil6* wurde reguliert gefunden. Yan *et al.* beschreiben, dass dieser in Endothelzellen unter Hypoxie hochreguliert wird. Ein weiteres Indiz dafür, dass man in Lungenhomogenat auch Genexpressions-Veränderungen aus Gefäßendothel ermitteln kann, liefert das Gen endothelin 1 (*End1*), welches zu beiden Zeitpunkten hochreguliert ist und besonders nach 3h zu den am stärksten regulierten Kandidaten-Genen gehört. *End1* wird nämlich, gerade im Lungengewebe, hauptsächlich von Endothelzellen gebildet^[27]. Jedoch beschreiben Tchekneva *et al.*, dass *End1* auch von glatten Gefäßmuskelzellen der Pulmonalarterien gebildet und sezerniert wird^[92]. Weiterhin hat die Gruppe beobachtet, dass sich die *End1*-Expression von großen und kleinen Pulmonalarterien unterscheidet^[92]. Die in dieser Arbeit beschriebene Expressionsveränderung von *End1* kann somit zwar auf Zellen der Pulmonalarterien zurückgeführt, jedoch nicht einem genauen Zelltyp oder einer genauen Lokalisation zugeordnet werden.

Neben Endothelzellen kommen für die frühen Reaktionen auf Hypoxie auch adventitielle Fibroblasten in Frage. Stenmark *et al.* beschreiben diese als einen der ersten Zelltypen, welche nach Aktivierung durch Hypoxie gefäßkontraktile Proteine und extrazelluläre Matrixproteine aktivieren sowie stimulierende Faktoren für glatte Muskelzellen und Vorläuferzellen ausschütten^[88]. Somit könnten die in der hier vorliegenden Arbeit gezeigten Expressions-Veränderungen von Genen, welche Matrixproteine oder gefäßkontraktile Proteine kodieren (s. Kap. 5.3.2.1), auch Signale aus Fibroblasten sein.

Ein weiteres Beispiel dafür, dass man gefundene Expressionsprofile bestimmten Zelltypen zuordnen kann, zeigen die im Signalweg des MHC-2-Komplexes gefundenen Gene. Wie in Kap. 5.3.2 näher beschrieben, war im Signalweg des MHC-2-Komplexes eine deutliche Herabregulation zahlreicher Gene nachweisbar. MHC-2-Komplexe kommen hauptsächlich in dendritischen Zellen, Makrophagen oder Typ II-Alveolarepithelzellen vor^[4,17,19]. Somit handelt es sich um Zelltypen, welche in der Lunge nicht den größten Anteil ausmachen und sich trotzdem mit großer Deutlichkeit in der Signalweg-Analyse zeigen (s. Kap. 5.3.2). Wie oben beschrieben, machen Alveolarmakrophagen und Typ II-Alveolarepithelzellen zusammen nur ca. 26% aller Zellen der Alveolarwand aus.

Als Gegenbeispiel kann man den Transkriptionsfaktor Egr1 anführen, welcher zwar in Endothelzellen und glatter Muskulatur der Bronchien sowie in Gefäßen durch Hypoxie reguliert wird^[52,77], aber in unseren Experimenten nicht als reguliert gefunden wurde (s. Kap. 5.2). Man könnte vermuten, dass die möglicherweise ablaufende Regulation des Gens in den Endothelzellen zu gering ist, um sich im Versuch zu zeigen. Je geringer der Anteil eines Zelltyps in untersuchtem Homogenat ist, desto höher ist auch die Wahrscheinlichkeit, dass Genregulations-Veränderungen bei Experimenten mit Homogenat vom Gesamteffekt der anderen Zellen überdeckt werden. Auch ist eine zunächst nur auf Proteinebene ablaufende Regulation möglich, welche im durchgeführten Experiment nicht erfasst werden kann. Weiterhin wäre es denkbar, dass verschiedene Kompartimente ein Gen gegensinnig regulieren und sich der Effekt einer Regulation in der Summe aufhebt. Natürlich können auch posttranskriptionale Abläufe die Regulation eines Gens verschleiern, was jedoch auch bei der Untersuchung einer isolierten Zelllinie nicht ermittelt werden kann.

Es wird somit deutlich, dass Genexpressionsprofile aus Homogenat immer im Kontext der beteiligten Zelltypen zu deuten sind. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass sich Expressionsmuster mit dem Wissen über die Abläufe in den Zellen auch einzelnen Zelltypen zuordnen lassen. Des Weiteren konnte mittels Immunhistochemie auf die Zellart geschlossen werden, in der ein Gen als differenziell exprimiert gefunden wurde (s. Kap. 4.4). Weitere Untersuchungen an isolierten Zelllinien im Kontext der frühen Zeitpunkte der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie könnten die gewonnenen Ergebnisse weiter spezifizieren.

5.2 Hypoxie-assoziierte Transkriptionsfaktoren

Zelluläre Hypoxie entsteht, wenn die Nachfrage nach Sauerstoff das vorhandene Sauerstoffangebot übersteigt. Molekularer Sauerstoff ist notwendig, um den ubiquitär benötigten Energieträger ATP herzustellen und damit die physiologischen Funktionen aufrechtzuerhalten. Allgemein reagieren Zellen unter hypoxischen Bedingungen mit der Hochregulation von Genen, die die anaerobe ATP-Synthese und / oder die Gewebedurchblutung fördern^[16]. Die Lunge unterscheidet sich in Bezug auf Hypoxie von vielen anderen Organen, beispielsweise durch die hypoxische Vasokonstriktion (s. Kap. 1.2). Deshalb war es besonders interessant, die Regulation bekannter, Hypoxie-assoziiierter Transkriptionsfaktoren zu diesen frühen Zeitpunkten unter Hypoxie in der Lunge zu beobachten. Beim Stichwort „Hypoxie-assoziierte Transkriptionsfaktoren“ sind neben HIF1-3, welchen die größte Bedeutung in diesem Kontext zuteil wird, noch andere, wie beispielsweise Nfil6 und Egr1, zu nennen (s. Kap. 1.2).

Nfil6 wurde im Microarray-Experiment bereits nach 3h Hypoxie mit einem M-Wert von 1.05 deutlich hochreguliert gefunden. Nach 24h war der M-Wert immer noch hoch, jedoch nur noch bei 0.73. *Nfil6* wird mittels Phosphorylierung (somit auf Proteinebene) aktiviert, wobei Cummins *et al.* unter anderem auch die in unserem Experiment zu beiden Zeitpunkten deutlich hochregulierte MAP-Kinase (M-Wert 3h: 1.71, 24h: 2.23) fanden^[16]. Zu den Zellen, in denen *Nfil6* nach bereits 3h hochreguliert wird, könnten Endothelzellen der Lungengefäße gehören (s. Kap. 5.1.2), da ein steigender *Nfil6*-mRNA-Spiegel unter Hypoxie bei dieser Zellart bereits beobachtet wurde^[112].

Egr1 ist ein weiterer Transkriptionsfaktor, welcher im Zusammenhang mit Hypoxie genannt wird. Doch obwohl er unter anderem auch mit Umbauprozessen der pulmonalen Gefäße in Zusammenhang gebracht wird, wurde das Gen an beiden Zeitpunkten nicht reguliert gefunden. Grund dafür könnte sein, dass *Egr1* erst nach länger andauernder Hypoxie sowie stärkeren Umbauprozessen der pulmonalen Gefäße auf transkriptionaler Ebene reguliert wird. Auf Proteinebene erfolgt die Aktivierung bereits nach wenigen Minuten^[16]. Auch die Protein-Kinasen C alfa und beta ($pkc\alpha$, $pkc\beta$), welchen eine Triggerfunktion für Hypoxie-induzierte *Egr1*-Regulation zugesprochen wird^[52], wurden nicht reguliert gefunden. Die Aktivierung von *Egr1* ist, im Gegensatz zu anderen Transkriptionsfaktoren wie p53, unabhängig von HIF1-3.

Wie bereits beschrieben (s. Kap. 1.2), nehmen Hif1-3 eine zentrale Rolle in der molekularen Pathophysiologie von Hypoxie-assoziierten Erkrankungen ein, weshalb diesen Transkriptionsfaktoren besondere Aufmerksamkeit gelten sollte. Um Gene zu finden, welche möglicherweise nach kurzer Hypoxie nicht durch Hif1 reguliert sind, wurde die DNA verschiedener Kandidaten-Gene auf die Konsensusnukleotidsequenz „ACGTGS“ (s. Kap. 4.1.2.3) sowohl in 5' → 3'- als auch in 3' → 5'-Richtung überprüft^[12]. Dabei wurden in den Genen zu beiden Zeitpunkten unabhängig davon, ob herauf- oder herabreguliert, in über 90% ein oder auch mehrere mutmaßliche *hypoxia responsive elements* (HREs) gefunden. Anhand Tab. 4.5 ist ersichtlich, dass viele schon als HIF-reguliert bekannte Gene auch in dieser Arbeit als Kandidaten-Gene gefunden wurden. Ke *et al.* haben HIF-regulierte Gene nach ihren biologischen Funktionen in Gruppen unterteilt^[36]. Tab. 5.1 zeigt, dass jeder dieser Gruppen mindestens ein hier als reguliert gefundenes Kandidaten-Gen zuzuordnen war.

Biologische Funktion	Genname; offizielles Symbol	GenBank Nummer
Regulator des Gefäßtonus	endothelin 1; End1	NM_010104
Erythropoese / Eisenstoffwechsel	transferrin; Trf ceruloplasmin; Cp	AF440692 NM_007752
Matrixstoffwechsel	plasminogen aktivator inhibitor; Serpine1	NM_008871
Glukosestoffwechsel	aldolase a; Aldoa lactate dehydrogenase a; Ldha	NM_007438 NM_010699
Zellproliferation	insulin-like growth factor 6; Igf6	NM_008344
Apoptose-Steuerung	bcl2/adenovirus e1b 19 kda-interacting protein 1; Bnip3	NM_009760

Tab. 5.1 Biologische Funktionen HIF-regulierter Gene (modifiziert nach Ke et al.)^[36]

Die aufgeführten Gene wurde nach 3h und / oder 24h Hypoxie gefunden.

Unter den HIF-regulierten Genen ist besonders *End1* als Regulator des Gefäßtonus hervorzuheben, welches nach 3h und 24h Hypoxie hochreguliert war. End1 nimmt einen wichtigen Stellenwert in der Entstehung der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie ein, indem es über eine starke vasokonstriktorische Aktivität den pulmonalarteriellen Druck erhöht^[26,66].

Zusammenfassend unterstreichen diese Beobachtungen den hohen Stellenwert von HIF1 und machen es wahrscheinlich, dass HIF1 auch zu frühen Zeitpunkten der Hypoxie ein bedeutender Transkriptionsfaktor ist und einen großen Anteil am veränderten Expressionsprofil hat.

5.3 Beurteilung der Expressionsmuster

Anhand der Abb. 4.10 lässt sich gut erkennen, dass Gene nachweisbar waren, welche nur nach 3h, nur nach 24h oder zu beiden Zeitpunkten als hoch- bzw. herabreguliert gefunden wurden. Es zeigte sich jedoch kein Gen, welches zu einem Zeitpunkt hoch- und später herabreguliert war (bzw. umgekehrt). Dass sich mehr Gene nach 24h als nach 3h als reguliert zeigten, war zu erwarten, da sich die Zellen nach einer längeren Hypoxie auf einen dauerhaften Zustand einstellen und die Expression von einzelnen Genen daraufhin verändern. Weiterhin finden Akutreaktionen häufig auf Proteinebene (z.B. Phosphorylierungen) statt, sodass eine daraus resultierende transkriptionale Regulation erst in der Folge sichtbar wird (s. Kap. 5.2). Interessant war, dass zahlreiche Gene nur nach 3h als differentiell reguliert gefunden wurden und nach 24h nicht mehr reguliert waren. Die Kapitel 5.3.1 und 5.3.2 erläutern die Gemeinsamkeiten

und Unterschiede der Resultate nach 3h und 24h Hypoxie und beschreiben funktionelle Zusammenhänge.

5.3.1 EXPRESSIONSMUSTER AUF MOLEKULARER EBENE

Mit Hilfe der Software AmiGO wurden die regulierten Kandidaten-Gene anhand ihrer molekularen Funktion in Gruppen eingeteilt (s. Kap. 4.1.2.5). Interessant war, dass sich nach 3h eine fast identische Verteilung (bezüglich der molekularen Funktion) der hochregulierten Gene wie nach 24h Hypoxie zeigte. Es scheinen somit bereits nach 3h Hypoxie sehr ähnliche Mechanismen in den Zellen abzulaufen wie nach 24h Hypoxie.

Unter den hochregulierten Kandidaten-Genen fällt die Gruppe der Gene auf, welche eine katalytische Funktion oder eine Bindungsfunktion, wie beispielsweise Endothelin 1, zugeschrieben wird (s. Abb. 4.13). In der 3h-Hypoxie-Gruppe werden beispielsweise 16 der hochregulierten Kandidaten-Gene mit einer katalytischen Funktion in Verbindung gebracht, wohingegen nur eines der herabregulierten Kandidaten-Gene katalytisch aktiv ist. Diese Beobachtung war zu erwarten, da die Zellen unter Hypoxie auf einen effizienteren Stoffwechsel angewiesen sind und durch die Katalyse verschiedener Reaktionen ein reduzierter Energieverbrauch erreicht werden kann^[2]. Auch nach 24h Hypoxie sind deutlich mehr katalytisch aktive Gene unter den hochregulierten Kandidaten-Genen zu finden. Trotzdem wurden auch zwölf herabregulierte Kandidaten-Gene mit katalytischer Funktion ausgemacht, was vermuten lässt, dass bestimmte Reaktionen aufgrund der Hypoxie nicht mehr ablaufen sollen und somit auch nicht mehr, beziehungsweise weniger stark, katalysiert werden.

Unter den Genen, welchen eine Bindungsfunktion zugeschrieben wird, wurden vor allem Gene gefunden, die den Untergruppen Nukleotid-, Nukleinsäure-, Protein- und Ionenbindung zuzuordnen waren. Gerade Gene der Ionenbindungsaktivität waren zu erwarten, da durch Hypoxie der Gefäßtonus der Lunge dauerhaft verändert wird. Dies geschieht unter anderem durch Calciumanstieg im Zytoplasma glatter Muskelzellen, was eine Änderung der Membranpotentiale und somit des Ionenhaushaltes zur Folge hat^[55]. Die übrigen Untergruppen geben einen Hinweis darauf, dass im Bereich der Nukleotid- und Nukleinsäurebindung, aber auch der Proteinbindung auf die Hypoxie reagiert wird, was sich auch schon in der großen Anzahl der als reguliert gefundenen Kandidaten-Gene nach 3h Hypoxie zeigte.

Im Vergleich zu den hochregulierten Kandidaten-Genen waren bei den herabregulierten Genen besonders die Gruppen der Signalübertragung und der Trans-

kriptionsfaktoren auffällig (s. Abb. 4.13). Nach 3h Hypoxie konnte bei acht der 27 herabregulierten Kandidaten-Gene die Funktion eines Transkriptionsfaktors zugewiesen werden. Demgegenüber stand lediglich der Transkriptionsfaktor Nfil6 (s. Kap. 5.2), welcher als einziger hochreguliert gefunden wurde. Dies lässt sich dadurch erklären, dass Nfil6 ein mit Hypoxie im Zusammenhang stehender Transkriptionsfaktor ist^[112]. Vermutlich werden bestimmte energiereiche oder nicht überlebenswichtige Stoffwechselprozesse in der Zelle, welche von einer guten Sauerstoffversorgung abhängig sind, unter Hypoxie zum Teil reduziert oder gar eingestellt.

Die Herabregulation von Kandidaten-Genen, welche der Signalübertragung zugeordnet werden, könnte ebenfalls dafür sprechen, dass die allgemeine Aktivität der Zellen während der Zeit der Hypoxie auf Überleben fokussiert wird.

5.3.2 EXPRESSIONSMUSTER IM KONTEXT ZELLULÄRER SIGNALWEGE

Um die auf zellulärer Ebene ablaufenden Prozesse und den Einfluss der als reguliert gefundenen Kandidaten-Gene auf verschiedene Signalwege der Zelle besser zu verstehen, wurde die Software Pathway-Express verwendet. Kandidaten-Gene konnten hiermit verschiedenen Signalwegen, basierend auf der KEGG Datenbank, zugeordnet werden (s. Kap. 3.2.6.4.4).

5.3.2.1 EXPRESSIONSMUSTER IM KONTEXT DES GEFÄßSYSTEMS DER LUNGE

Ein besonderes Augenmerk wurde bei der Beurteilung der Expressionsprofile auf Veränderungen in Bezug auf das Gefäßsystem der Lunge gerichtet. Hier stellte sich die Frage, ob zu diesen frühen Zeitpunkten unter Hypoxie (besonders nach 3h) schon differentielle Genexpressionen nachzuweisen waren, welche im Kontext der pathophysiologischen Abläufe bei chronischer Hypoxie zu deuten sind (s. Kap. 1.2 und Kap. 1.3). Tatsächlich zeigten sich bereits nach 3h und noch stärker nach 24h zahlreiche Gene, welche in der Literatur im Zusammenhang mit Vasokonstriktion, vaskulärem Remodeling und Angiogenese genannt werden.

Ein für Umbauprozesse von Gefäßen sehr wichtiges Protein ist End1 (s. Kap. 5.4)^[114]. Das Gen *End1* wurde zu beiden Zeitpunkten als deutlich hochreguliert gefunden (M-Wert 3h: 2.24, 24h: 1.87). Diese starke Regulation zeigt den exponierten Stellenwert von End1 bei der Antwort der „Lunge“ auf Hypoxie. Primär wird durch End1 eine Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen verursacht^[48], was zu den untersuchten Zeitpunkten der Hypoxie der wahrscheinlichste Grund für die Regulation darstellt. Langfristig nimmt End1 wegen der durch MAP-Kinasen vermittelten Umbauprozesse

und Proliferation von Gefäßen der Lunge eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie ein^[48,114].

Bereits nach 3h Hypoxie wurden im TGF-beta-Signalweg mit *Fst* und *Thbs1* zwei Gene deutlich hochreguliert gefunden (s. Tab. 4.1), welche einen direkten hemmenden Einfluss auf Tgfb1 (transforming growth factor, beta 1) -hemmende Gene haben. Auch der *impact factor* des genannten Signalweges von 9.6 weist auf die hohe biologische Relevanz der als reguliert gefundenen Kandidaten-Gene im genannten Signalweg hin. Dem Wachstumsfaktor und Cytokin TGFB1 wird neben immun-supprimierender Wirkung vor allem eine große Bedeutung in der Angiogenese und dem Aufbau der extrazellulären Matrix zugeschrieben^[25,61]. Von Kobs *et al.* wird TGFB1 als wichtiger Wachstumsfaktor im Rahmen des vaskulären Remodelings der durch chronische Hypoxie induzierten pulmonalen Hypertonie beschrieben. TGFB1 beeinflusst die Umbauvorgänge vor allem durch Hypoxie-induzierte Kollagenproduktion in Fibroblasten^[42]. Da Stenmark *et al.* die Fibro- und Myofibroblasten zu den ersten Zelltypen zählen, welche Hypoxie-induziert einer Migration und Proliferation in der Adventitia der Lungengefäße unterliegen, passt TGFB1 gut in diesen Zusammenhang^[88]. Nach 24h Hypoxie wurde neben *Fst* und *Thbs1* auch *Tgfb1* selbst hochreguliert gefunden, was die Beobachtung nach 3h Hypoxie noch weiter unterstreicht. Da *Tgfb1* in der Literatur auch im Zusammenhang mit der Kompensation akuter Lungenverletzungen und der Entstehung eines akuten Lungenversagens genannt wird, scheint dieses Gen eine zentrale Rolle bei der Bewältigung akuter Stresssituationen der Lunge einzunehmen^[107]. Eine interessante Verknüpfung zeigt sich auch zum MAP-Kinase-Signalweg. Die dort beobachtete (s. Kap. 5.3.2.2) Hemmung der Erk (extracellular signal-regulated kinase) fördert die Aktivität im TGF-beta-Signalweg zugunsten von Transkriptionsfaktoren und Coaktivatoren der Angiogenese und der Differenzierung der extrazellulären Matrix. Dieser Effekt ist bereits nach 3h Hypoxie nachweisbar, was ein Hinweis auf eine bereits früh eingeleitete *Tgfb1*-Expression sein könnte.

Ein im Kontext der Angiogenese ebenfalls erwähnenswerter Signalweg ist der der Koagulations-Kaskade. Nach 3h Hypoxie wurde hier thromboplastin (*F3*) hochreguliert gefunden. *F3* aktiviert unter anderem thrombin (*F2*), welches bei der Bindung an den thrombin-2-receptor (*F2r*) eine Aktivierung von Endothelzellen und glatten Muskelzellen herbeiführt und hierüber eine Angiogenese fördert. Interessant ist, dass *F2r* nach 24h Hypoxie ebenfalls hochreguliert gefunden wurde. Weiterhin wurden im genannten Signalweg *Plat* und sein Inhibitor *Serpine1* jeweils hochreguliert gefunden. Diesen Proteinen wird von Binder *et al.* ein großer Stellenwert im Zusammenhang mit

Angiogenese zugeschrieben^[8]. Somit scheint hier, auf einem Tgfb1-unabhängigen Weg, eine weitere Signalkette zur Bildung neuer Gefäße oder zur Induktion des vaskulären Remodelings abzulaufen. Dass Gefäßneubildungen in der Lunge möglich sind, wurde im Zusammenhang mit der primär pulmonalen Hypertonie beobachtet^[101]. Hyvelin *et al.* konnten eine kapilläre Angiogenese in der Lunge bei hypoxisch gehaltenen Ratten nach einer Woche nachweisen^[34]. Auch Stenmark *et al.* beschreiben eine Zunahme der Gesamtzahl von Endothelzellen in der Lunge unter chronischer Hypoxie^[88].

In Bezug auf das Remodeling von Gefäßen spielen auch Umbauprozesse der extrazellulären Matrix eine große Rolle. Durch Migration und Proliferation von Zellen kommt es, ausgehend von der extrazellulären Matrix, zu einer Verdickung der Adventitia der Pulmonalarterien^[88]. Da dies Reaktionen auf chronische Hypoxie sind, war es umso erstaunlicher, bereits nach kurzer Hypoxie zahlreiche Gene den Signalwegen der extrazellulären Matrix zuordnen zu können. *Thbs1*, tenascin C (*Tnc*), tenascin N (*Tnn*) und verschiedene Kollagene beispielsweise, welche alle nach 24h Hypoxie hochreguliert waren, interagieren mit Adhäsionsmolekülen verschiedenster Zellen. Es handelt sich bei den erwähnten Adhäsionsmolekülen um Integrine, welche Oberflächenmoleküle mit einer großen Bedeutung für die Kommunikation zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix sind^[70]. Da es sich beim Remodeling von Gefäßen und Angiogenese um dynamische Prozesse handelt, welche ein Interagieren zwischen verschiedenen Zelltypen erfordern, könnten auch die hier beobachteten Veränderungen in der Zellkommunikation die Bildung neuer oder veränderter Gefäße zum Ziel haben^[87]. Zumal die auf transkriptionaler Ebene hochreguliert gefundenen und der extrazellulären Matrix zugehörigen Proteine Timp1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1) und *Thbs1*, auch in engem Zusammenhang mit Tgfb1 stehen, indem sie es binden und damit aktivieren können^[81,107]. Weiterhin konnten Jones *et al.* zeigen, dass eine *Tnc*-Induktion mit Veränderungen in pulmonalen Gefäßen einhergeht, indem das Wachstum von glatten Gefäßmuskelzellen stimuliert wird^[35]. Insgesamt finden sich somit zahlreiche Hinweise, dass bereits nach frühen Zeitpunkten der Hypoxie die extrazelluläre Matrix Veränderungen am Gefäßsystem einleitet.

Auch das Gen *Retnla*, welches nach 24h deutlich hochreguliert gefunden wurde (M-Wert 3.53), ist ein interessanter Kandidat im Rahmen der Reaktionen der Lunge auf Hypoxie. Teng *et al.* konnten zeigen, dass *Retnla* unter Hypoxie nur in der Lunge exprimiert wird^[94]. Die in der Literatur angegebene Lokalisation des Proteins im Bronchialepithel, dem Gefäßsystem der Lunge und Typ II-Alveolarepithelzellen konnte

zum Teil durch diese Arbeit bestätigt werden (s. Abb. 4.19). Yamaji-Kegan *et al.* konnten ebenfalls zeigen, dass *Retnla* Einfluss auf die Vasokonstriktion, die Angiogenese (über eine Stimulation der Vegf Produktion) sowie die Neubildung glatter Muskelzellen hat^[49,111]. Weiterhin beschreiben Liu *et al.*, dass über *Retnla* eine TGFB1-unabhängige Stimulation glatter Gefäßmuskelzellen erfolgt und die Produktion von Typ 1-Kollagen angeregt wird^[51]. Da jedoch im Rahmen der pulmonalen Hypertonie bisher wenig zu *Retnla* bekannt ist, handelt es sich aufgrund der genannten Beobachtungen um ein interessantes Kandidaten-Gen, welches schon zu frühen Zeitpunkten unter Hypoxie Umbauprozesse in der Lunge und vor allem Remodelingvorgänge an den Lungengefäßen einleiten kann.

Die bereits in diesem Kapitel erwähnten Gene *Plat* und *Serpine1* beeinflussen die Umbauprozesse im Gefäßsystem über Interaktionen mit der extrazellulären Matrix (über Integrine) und Förderung der Migration von Zellen^[8]. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass durch den Hypoxie-Reiz bereits nach 3h von Seiten der extrazellulären Matrix und über die Wachstumsfaktoren *Hbegf* (heparin binding EGF-like growth factor), *Ctgf* (connective tissue growth factor) und *Pdgf* ebenfalls Änderungen der Intrazellulärstrukturen eingeleitet werden. Nach 24h Hypoxie kommen hier sogar noch die Wachstumsfaktoren *Vegfc*, *Ilgf6* (insulin-like growth factor 6) und *Figf* (c-fos induced growth factor) hinzu. Wie und in welcher Form diese Änderungen ablaufen, lässt sich nur vermuten, da alle genannten Proteine am Anfang komplexer, intrazellulär ablaufender Signalkaskaden stehen. Möglich wären Änderungen am Zytoskelett in Form einer Reorganisierung der Aktinfilamente oder der Ausbildung von Stressfibrillen. Aber auch das Einleiten erster Schritte eines vaskulären Remodelings der einzelnen Gefäßabschnitte (s. Kap. 1.2) oder einer induzierten Zellproliferation wären denkbar^[47,81]. Diese ersten Veränderungen können sich in der Adventitia abspielen, welche Stenmark *et al.* als die Region nennen, in der beim Remodeling von Pulmonalgefäßen die ersten Änderungen vorzuweisen sind^[88]. Letztlich kann die in Kap. 5.3.1 und 5.4 erwähnte Veränderung von Genen der Ionenbindung (vor allem Calcium und Kalium), welche vermutlich aufgrund der hypoxischen Vasokonstriktion zustande kommt, ebenfalls den Weg zu einem vaskulären Remodeling bahnen^[55].

Zusammenfassend zeigten sich somit bereits nach wenigen Stunden Hypoxie nicht nur Gene als reguliert, welche eine Vasokonstriktion der Pulmonalgefäße verursachen, sondern auch in engem Zusammenhang mit vaskulärem Remodeling stehen. Dies war in solchem Umfang nach wenigen Stunden Hypoxie nicht zu erwarten, da das Remodeling in der Literatur fast ausschließlich im Zusammenhang

mit chronischen Prozessen, wie beispielsweise einer Tage bis Wochen andauernden Hypoxie, beschrieben wird^[31,42,88].

5.3.2.2 MAP-KINASE-SIGNALWEGE UND ZELLZYKLUS

Der MAP-Kinase-Signalweg wurde nach 3h Hypoxie mit dem zu diesem Zeitpunkt höchsten *impact factor* (13.4) aller Signalwege gefunden. Dies war insofern zu erwarten, als dass der Signalweg zahlreiche Gene enthält, welche als *immediate early genes* (IE) bezeichnet werden^[32]. Hierbei handelt es sich um Gene, welche beispielsweise enzymatisch reguliert sind und nicht erst mittels einer langen transkriptionalen Kaskade durch verschiedene Transkriptionsfaktoren reguliert werden müssen. Diese Gene werden zumeist quantitativ reguliert, was bedeutet, dass das jeweilige Gen nicht erst an- oder abgeschaltet werden muss, sondern einer ständigen Expression unterliegt. Diese wird dann von der Zelle, vergleichbar mit einem Regelwiderstand, je nach Bedarf angepasst^[32].

Auf transkriptionaler Ebene ist der MAP-Kinase-Signalweg unter anderem für die Antwort der Zelle auf zahlreiche Vorgänge innerhalb der extrazellulären Matrix verantwortlich. Er kontrolliert beispielsweise über Protein-Kinasen oder Protein-Phosphatasen die Expression von Genen, welche für Wachstumsfaktoren und Cytokine kodieren^[108]. Weiterhin hat er eine zentrale Rolle bei der Reaktion der Zelle auf Stressimpulse und Inflammation inne^[44]. Bei den als hochreguliert gefundenen Kandidaten-Genen war besonders interessant, dass sie Moleküle von drei der vier zentralen Reaktionsketten, welche dem MAP-Kinase-Signalweg angehören, dephosphorylieren und diese „Zweige“ dadurch blockieren. Durch die Hemmung von p38, Erk und Jnk (*c-Jun N-terminal kinase*) wird der Einfluss auf Proliferation, Zelldifferenzierung und Inflammation reduziert^[35]. Auch im Zellzyklus zeigten sich nach bereits 3h Hypoxie drei hochregulierte Gene, welche an zentralen Stellen hemmend wirken: *Gadd45g* (definition growth arrest and DNA-damage-inducible 45, gamma) und *Gadd45b* (definition growth arrest and DNA-damage-inducible 45, beta) blockieren wichtige Kinasen in der G2- und M-Phase des Zellzyklus^[98]. *Cdkn1a* (cyclin-dependent kinase inhibitor 1a [p21]) ist ein Inhibitor von Kinasen der S- und G1-Phase. In der Literatur wird das Protein Cdkn1a sogar als Hemmer des Wachstums von Lungenalveolarzellen beschrieben^[95]. Die beobachteten Hemmungen im Zellzyklus sowie im MAP-Kinase-Signalweg passen zu einer Beobachtung von Ten *et al.*, nach welcher Endothelzellen unter Hypoxie ihre Proteinsynthese deutlich reduzieren^[93]. Zusammenfassend sind dies einige Hinweise, wonach der Stoffwechsel in zumindest einem Teil der Zellen heruntergefahren wird.

Jedoch wurden mit *Ntrk1* (neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1) und *Pdgfb* auch zwei den MAP-Kinase-Signalweg aktivierende Gene nach 3h hochreguliert gefunden; beide stehen am Anfang des MAP-Kinase-Signalwegs. Pdgf wurde von Schermuly *et al.* als potentes Mitogen beschrieben, welches die Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen in der Lunge steigert^[75]. Dies passt zu den Beobachtungen aus Kap. 5.3.2.1, wo noch weitere Zusammenhänge mit vaskulären Remodelingprozessen genannt werden.

Letztlich kann man anhand der durchgeführten Experimente nicht klären, ob die den Signalweg an Schlüsselstellen hemmenden Gene nur reguliert sind, um die aktivierenden Gene in ihrer Reaktionsstärke zu puffern oder ob unabhängig von diesen eine Hemmung des MAP-Kinase-Signalweges stattfindet. Naheliegend ist auch, dass sich hier Effekte verschiedener Zellen an unterschiedlichen Stellen eines Signalweges überlagern. Ein Teil der Zellen reagiert auf Hypoxie mit einem Bremsen wachstumsfördernder Regelkreise, um beispielsweise keine unnötige Energie zu verbrauchen. Dies würde auf Teile des MAP-Kinase-Signalwegs sowie die regulierten Gene des Zellzyklus zutreffen. Bei den betroffenen Zellen kann es sich um Zellen der Immunantwort (s. Kap. 5.3.2.3) oder Alveolarepithelzellen handeln^[95]. Andere Zellen hingegen aktivieren den MAP-Kinase-Signalweg, um vielleicht eine Genexpression anzuregen, welche der Hypoxie in Form von Vasokonstriktion oder Remodelingprozessen entgegenwirkt (s. Kap. 5.3.2.1). Lanner *et al.* halten Teile des MAP-Kinase-Signalweges für nötig, um Hypoxie-induzierte Proliferation, beispielsweise von glatten Muskelzellen, zu ermöglichen^[46]. Zu den bereits nach 3h regulierten Genen des MAP-Kinase-Signalwegs kommen nach 24h Hypoxie noch 3 weitere, den Signalweg stimulierende Gene hinzu. Jedoch sind die den Signalweg hemmenden Gene weiterhin und in gleicher Stärke reguliert, was keinen Anhalt dafür bietet, dass sich nach 24h Hypoxie grundlegende Änderungen in der Regulation des beschriebenen Signalweges ergeben haben.

5.3.2.3 VERÄNDERUNGEN VON SEITEN DES IMMUNSYSTEMS

Auch die hinsichtlich des Immunsystems gefundenen Regulationen waren aufschlussreich: Der Signalweg für Antigenpräsentation zeigt mit einem *impact factor* von 46.3, dass hier von einer hohen biologischen Bedeutung der gefundenen, in den Signalweg involvierten Gene auszugehen ist. Mit *H2-ea* (histocompatibility 2, class II antigen E alpha), *H2-eb1* (histocompatibility 2, class II antigen E beta) und *H2-aa* (histocompatibility 2, class II antigen A, alpha) wurden wichtige Gene des MHC-2-Komplexes (major histocompatibility complex, class II) deutlich herabreguliert gefunden (M-Wert nach 24h: -0.72, -0.52, -0.7). Der MHC-2-Komplex zählt zu den

Zelladhäsions-Molekülen und spielt über Antigenpräsentation bei der Aktivierung von CD4-positiven T-Zellen, eine zentrale Rolle^[60]. Da diese wiederum durch Cytokinproduktion und Aktivierung anderer Immunzellen bei der Immunantwort des Körpers auf Krankheitserreger eine zentrale Bedeutung einnehmen^[4], ist bereits nach 24h Hypoxie von einer Schwächung des Immunsystems auszugehen. Gestützt wird diese These noch durch weitere herabregulierte Gene, welche im genannten Signalweg dem MHC2-Komplex unmittelbar vorgeschaltet sind. MHC-2-Komplexe kommen hauptsächlich in Makrophagen und B-Lymphozyten vor (s. Kap. 5.1.2). Alternativ zur zuvor vermuteten Herabregulation der Gene könnten auch unter Hypoxie weniger Makrophagen in die Lunge einwandern, was sich auf transkriptionaler Ebene ähnlich darstellen würde. Diese Beobachtung konnte von einem Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe, Zeevi Israeli, jedoch nicht gemacht werden. Im Rahmen seiner Dissertation mit dem Thema: „*Hypoxia-induced gene expression in alveolar macrophages*“, konnte er weder nach 24h noch nach 21 Tagen Hypoxie eine veränderte Anzahl alveolärer Makrophagen in der bronchoalveolären Lavage feststellen. Madjdpour *et al.* berichteten, dass die Anzahl an Makrophagen in der bronchoalveolären Lavage bei Ratten unter Hypoxie innerhalb der ersten acht Stunden zunimmt^[54]. Somit scheint eher eine Herabregulation der genannten Gene des Signalweges der Antigenpräsentation vorzuliegen, als dass unter Hypoxie weniger Makrophagen in die Lunge einwandern. Letztlich kann dies anhand der Microarray-Daten jedoch nicht unterschieden werden.

Taraseviciene-Stewart *et al.* konnten durch eine Schwächung des Immunsystems in Form eines T-Zell-Mangels (bei athymischen Ratten) eine Steigerung des vaskulären Remodelings bei Mäusen nachweisen^[91]. Diese Beobachtung ist vor allem deshalb interessant, weil bei zahlreichen Erkrankungen, die eine pulmonale Hypertonie auslösen (s. Kap. 1.3), Defekte bei CD4-positiven T-Zellen vorliegen^[91]. Dieser Zusammenhang könnte die beschriebenen Vorgänge im Signalweg für Antigenpräsentation insofern erklären, als dass unter einem Mangel an T-Zellen das Remodeling der Lungengefäße leichter abläuft.

Auch der MAP-Kinase-Signalweg ist in diesem Kontext zu erwähnen, da hier durch die in Kap. 5.3.2.2 beschriebene, teilweise Hemmung ebenfalls weniger stark regulierend und aktivierend auf Cytokine und Zellen der Immunantwort reagiert werden kann^[108]. Aufgrund der durch Hypoxie verursachten Stresssituation könnte somit bereits nach 24h eine, unter Umständen den ganzen Körper betreffende Schwächung des Immunsystems vorzuliegen. Nach 3h Hypoxie wurden noch keine Gene als reguliert

gefunden, die sich in die Signalwege der Antigenpräsentation oder Zelladhäsion einordnen ließen.

5.4 Bedeutung der Ergebnisse in Bezug auf Therapieansätze bei pulmonaler Hypertonie

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist eine schwer therapierbare Erkrankung. Mitte der 80er-Jahre betrug die mediane Überlebenszeit nach der Diagnosestellung bei primär pulmonaler Hypertonie nur 2.8 Jahre. Wenn nicht die primäre pulmonale Hypertonie, sondern eine andere Grunderkrankung die Ursache der PH ist (s. Kap. 1.3), hängen die Therapiemöglichkeiten stark vom Behandlungserfolg der Grunderkrankung ab. Vor allem im letzten Jahrzehnt konnte jedoch der Krankheitsverlauf durch neue Therapieansätze positiv beeinflusst werden^[48]. So lassen sich mittlerweile drei Signalkaskaden in der Pathophysiologie der PH ausmachen, welche mit den entsprechenden Medikamenten beeinflusst werden können: Es handelt sich um die vier Wirkstoffklassen Calcium-Kanal-Blocker, Prostacyclin-Analoga, Endothelin-Rezeptor-Antagonisten sowie Phosphodiesterase-5-Inhibitoren^[53,69]. Alle wirken über verschiedene Mechanismen mehr oder weniger stark vasodilatatorisch auf die glatten Muskelzellen der Lungengefäße und haben zusätzlich einen antiproliferativen Effekt^[48].

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lassen sich keine neuen Therapien ableiten. Dennoch bestehen Parallelen zwischen den gefundenen Genexpressions-Veränderungen und den in der Praxis eingesetzten Therapieschemata.

Bereits nach 3h und stärker noch nach 24h waren für Vasokonstriktion (*End1* und *Pdgfb*), Adhäsion (*Plat* und *F3*) und Matrixbildung (*Thbs1*) verantwortliche Gene reguliert (s. Kap. 4.1.2.1). Nach Stenmark *et al.* werden die entsprechenden Proteine vor allem von Endothelzellen unter chronischer Hypoxie produziert und sezerniert^[89]. Es ist daher etwas überraschend, dass bereits nach kurzer Hypoxie Gene gefunden werden, deren Genprodukte in ihrer Funktion den genannten therapeutischen Effekten der derzeitigen Medikamente gegenüber stehen. Am deutlichsten zeigte sich von den genannten Genen das zu beiden Zeitpunkten stark hochregulierte Gen *End1*. Besonders nach 3h Hypoxie zählten *End1* und seine Vorstufe *End1-precursor* zu den am stärksten regulierten Kandidaten-Genen (s. Tab. 4.1). Das letztlich entstehende, 21 Aminosäuren umfassende Polypeptid wird von Gefäßendothelzellen freigesetzt. Ihm wird als starker Vasokonstriktor eine sehr große Bedeutung im Rahmen der PH zugeschrieben^[48]. Therapeutisch werden deshalb seit wenigen Jahren die Endothelin-

Rezeptor-Antagonisten eingesetzt, die die Rezeptoren für END1 an den glatten Gefäßmuskelzellen und im Gefäßendothel blockieren.

Weiterhin wurden neun Gene gefunden, deren molekulare Funktion als Calcium-bindend eingestuft wurde (s. Kap. 4.1.2.5). Als Beispiel lassen sich die Gene *hippocalcin* (*hpca*) und *transmembrane protein 37* (*Tmem37*) anführen. Zwei der Kandidaten waren bereits nach 3h, sieben nach 24h Hypoxie reguliert. Dies ist von Bedeutung, da die mittels End1 erzeugte Vasokonstriktion durch einen Calciumanstieg im Zytoplasma erreicht wird, was wiederum die Kontraktion der Gefäßmuskulatur zur Folge hat. Der intrazelluläre Calciumspiegel wird sowohl durch Calciumeinstrom von außen als auch durch die intrazelluläre Calciumfreisetzung in den Gefäßmuskelzellen erhöht. Mauban *et al.* erwähnen in diesem Zusammenhang auch die kontrovers diskutierte Möglichkeit, dass die glatten Gefäßmuskelzellen selbst anhand der Sauerstoffspannung den Calciumhaushalt mit regulieren können^[55]. Da ein erhöhter Calciumspiegel glatte Gefäßmuskelzellen zur Proliferation und Migration anregt, wirkt sich eine Therapie mit Calcium-Kanal-Blockern auch positiv auf ein mögliches vaskuläres Remodeling aus^[55].

Auch hinsichtlich neuer Therapieansätze mit Pdgf-Rezeptor-Antagonisten lassen sich Parallelen zu den Ergebnissen dieser Arbeit ziehen. Das Gen *Pdgfb* war zu beiden Zeitpunkten hochreguliert und hat, wie in Kap. 5.3.2.2 näher beschrieben, Einfluss auf glatte Gefäßmuskelzellen. Im Tierversuch konnte laut Puri *et al.* gezeigt werden, dass Pdgf-Rezeptor-Antagonisten das vaskuläre Remodeling in der Lunge reduzieren und eine Verbesserung der PH herbeiführen^[69,75].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass bereits nach wenigen Stunden Hypoxie Mechanismen in der Lunge ablaufen, die auch bei therapiebedürftiger PH in ähnlicher Weise vorkommen. Weiterhin konnte im Kap. 5.3 gezeigt werden, wie früh Gene reguliert sind, welche mit Remodeling-Prozessen in Verbindung gebracht werden können. Als Fazit lässt sich daraus schließen, dass, die Therapie der PH möglicherweise früher begonnen werden sollte (ein rechtzeitiges Erkennen der Erkrankung vorausgesetzt), um den antiproliferativen Effekt einiger Therapeutika zu nutzen, was dem späteren, irreversiblen Remodeling der Lungengefäße effektiver vorbeugen könnte. Denn je stärker die Umbauprozesse in der Lunge vorangeschritten sind, desto geringer ist der therapeutische Effekt der Vasodilatoren^[88].

5.5 *Bcar3* und seine Bedeutung für die Hypoxie-induzierten Veränderungen in der Lunge

Das Gen *Bcar3* (Synonym: *and-34*) wurde im Microarray-Experiment nach 3h Hypoxie mit einem M-Wert von 0.84 als deutlich hochreguliert gefunden. Weder das Gen selbst noch das daraus entstehende Protein (p130Cas-binding-protein) wurde in der Literatur im Kontext von Hypoxie, Lunge oder Angiogenese beschrieben. Das Protein wiegt 92.3 kDa, besitzt eine Ras-GEF-Domäne und eine SH2-Domäne. Mittels Immunhistochemie wurde *Bcar3* im Bronchialepithel der Lunge nachgewiesen (s. Kap. 4.4). Weiterhin wurden zwei *hypoxia responsive elements* (HREs), je einer im codierenden Strang (-4644bp) und im Gegenstrang (-4641bp), von der für das Gen kodierenden Sequenz entfernt, gefunden. Dies liefert einen Hinweis, dass *Bcar3* ein von Hif reguliertes Gen sein kann.

Das Protein spielt bei der intrazellulären Signaltransduktion für die Entstehung neuer Brustkrebszellen in Anti-Östrogen-resistenten Tumoren eine Rolle^[21]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von *Bcar3* eine Zellproliferation zur Folge hat^[99]. Diese wird über die ubiquitär vorkommende Thyrosinkinase c-src, die zu der Gruppe der src-family-kinases (SFKs) gehört, vermittelt. Das Protein hat einen großen Einfluss auf die Proliferation und Migration von Zellen^[40]. Es ist weiterhin bekannt, dass Hypoxie im Allgemeinen über eine Thyrosinkinase-Kaskade und im Speziellen über die Thyrosinkinase c-src, eine Expression von VEGF einleitet^[58,96]. Dies lässt vermuten, dass *Bcar3* unter Hypoxie bereits an frühen Zeitpunkten eine Kaskade zwecks Hochregulation von *Vegf* einleitet.

Durch *Bcar3* werden Änderungen in der Expression anderer Gene verursacht, die hauptsächlich den Bereichen Zell-Zell-Adhäsion, Aufbau extrazellulärer Matrix und Kontrolle von Zellwachstum und Stoffwechsel zuzuordnen sind^[21,71]. Laut Vervoort *et al.* geschieht dies über die erwähnte Ras-GEF-Domäne, welche wichtige Proteine des Integrin-Adhäsionskomplexes bindet. Dieser wirkt sich wiederum regulierend auf die Proliferation und Migration von Zellen aus^[100]. In dieser Arbeit wurden zahlreiche Gene nachgewiesen, die in die genannten Signalwege eingeordnet werden können (s. Kap. 5.3.2).

Aus den oben genannten Fakten über *Bcar3* kann man schlussfolgern, dass dieses Gen gerade zu frühen Zeitpunkten unter Hypoxie eine Kaskade in Gang bringt, welche die hypoxische Situation zu kompensieren versucht. Besonders interessant ist die Tatsache, dass *Bcar3* Einfluss auf die Migration und Proliferation von Zellen hat^[100]. Somit wäre es denkbar, dass durch *Bcar3* die ersten Schritte des vaskulären

Remodeling eingeleitet werden. Nach 24h ist das Gen allerdings nicht mehr als reguliert nachzuweisen. Man kann daraus schließen, dass nun andere Mechanismen in der Lunge versuchen, der Hypoxie entgegenzuwirken und *Bcar3* nur in der initialen Phase der Hypoxie eine Rolle spielt, um bestimmte Abläufe einzuleiten. Immunhistochemisch konnte das Protein nur im Bronchialepithel der Lunge nachgewiesen werden (s. Kap. 4.4) und befindet sich somit in einer Region der Lunge, der bisher in der Literatur keine zentrale Position in der Reaktion auf Hypoxie zugeschrieben wird^[88]. Dies alles macht *Bcar3* zu einem interessanten Kandidaten, da ihm eine Schlüsselrolle an frühen Zeitpunkten der Hypoxie zugeschrieben werden könnte.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Durch chronische Hypoxie kommt es in der Lunge zu Genexpressions-Veränderungen, welche unter anderem Einfluss auf den pulmonalarteriellen Druck nehmen und zu einem vaskulären Remodeling führen. Um die in der Lunge ablaufenden Prozesse besser zu verstehen, wurden in dieser Arbeit zu frühen Zeitpunkten (3h und 24h) nach Hypoxie-Induktion die Veränderungen auf transkriptionaler Ebene untersucht. Hierzu wurden mit Hilfe der Microarray-Technologie die Gen-Expressionsprofile aus Lungenhomogenat (mittels extrahierter RNA) von hypoxisch mit normoxisch gehaltenen Mäusen verglichen. Anschließend wurden 13 Kandidaten-Gene mit Hilfe der real-time-PCR validiert. Hierbei fand sich eine gute Korrelation mit den Microarraydaten. Weiterhin wurde die Lokalisation des Genproduktes zweier Kandidaten-Gene im Mauslungen-Gewebe mittels Immunhistochemie ermittelt.

Es wurden bereits nach 3h Hypoxie 115 und nach 24h 342 Gene als reguliert gefunden. Ein Großteil der nach 3h regulierten Kandidaten-Gene fand sich auch nach 24h. Das Verteilungsmuster der hochregulierten Kandidaten-Gene war im Vergleich beider Zeitpunkte hinsichtlich ihrer molekularen Funktion sehr ähnlich. Hier fielen vor allem Gene der Ionen-, Nukleotid- und Nukleinsäure-Bindung auf. In Bezug auf das Gefäßsystem der Lunge zeigten sich nach 3h sowie noch deutlicher nach 24h zahlreiche Gene, welche in direktem Zusammenhang mit Hypoxie-induzierter Vasokonstriktion, vaskulärem Remodeling und Angiogenese stehen (z.B. *End1*, *Tgfb1*). Zu frühen Zeitpunkten konnten weiterhin mehrere zelluläre Signalwege ermittelt werden, über die unter Hypoxie Veränderungen im Gefäßsystem der Mauslunge ablaufen (z.B. der TGF-beta-Signalweg oder Signalwege der extrazellulären Matrix-Bildung und die Koagulations-Kaskade). Am Beispiel der Signalwege des Zellzyklus und der Antigen-Präsentation ergaben sich Hinweise, dass zu frühen Zeitpunkten wichtige Signalkaskaden in der Lunge gehemmt werden. Weiterhin konnte der Stellenwert des Transkriptionsfaktors Hif1-3 im Kontext der Hypoxie durch die vorliegenden Ergebnisse gestützt werden.

Anhand der Signalweg-Analyse wurde deutlich, dass das Microarray-Experiment gute Möglichkeiten bietet, um weitere Hypothesen zu generieren oder weiterführende Untersuchungen für bestimmte Gene durchzuführen. Dies erfolgte hier anhand der Genprodukte von *Bcar3* oder *Retnla*. Schließlich konnte die transkriptionale Regulation mehrerer Gene, die bei aktuellen Therapieansätzen eine Rolle spielen, bestätigt werden.

7 Abstract

Chronic hypoxia causes changes in gene expression in the lung, which affect the pulmonary arterial pressure and causes vascular remodelling, among other effects. In order to improve the understanding of the processes taking place within the lung, the present work examined the changes on the transcriptional level, as apparent at early points of time (3h and 24h) after induction of hypoxia. To this end, microarray technology was employed to compare the gene expression profiles from lung homogenate (by means of extracted RNA) of mice held at hypoxic conditions with that of mice held at normoxic conditions. Subsequently 13 candidate genes were validated by means of real-time PCR, which showed a good correlation to the microarray data. Furthermore, the localization of two of the candidate genes within mouse lung tissue was determined by immunohistochemistry.

After only 3h, 115 genes were found to be regulated, 342 genes after 24h. A large part of those candidate genes found to be regulated after 3h was also found after 24h. Comparing the two points in time, the distribution pattern of highly regulated candidate genes was very similar with regards to their molecular function. Among these, genes of ionic, nucleotide and nucleic acid bonds were the most prominent. With respect to the vascular system of the lung, many genes with direct relation to hypoxia-induced vasoconstriction, vascular remodelling and angiogenesis (e.g. *End1*, *Tgfb1*) appeared after 3h, and again several more after 24h. Furthermore, at early points in time numerous cellular signalling pathways were detected by which changes within the vascular system of the hypoxic mouse lung take place (e.g. the TGF beta signalling pathway, or signalling pathways of extracellular matrix formation and the coagulation cascade). On the other hand, at early points expression changes were found that indicate the inhibition of important signalling cascades of the lung exemplarily in cell cycle signalling pathways and antigen presentation. In addition, the significance of the transcription factor Hif1-3 within the context of hypoxia was supported by the present results.

The analysis of signalling pathways showed that the microarray experiment offers good opportunities for generating additional hypotheses or for carrying out further studies of specific genes. In the present work, these were conducted by means of the gene products of *Bcar3* or *Retnla*. Finally, transcriptional regulation of genes that play a role in therapeutic approaches could be confirmed.

8 Literaturverzeichnis

1. Acker H, (1994): Mechanisms and meaning of cellular oxygen sensing in the organism. *Respir Physiol* **95**:1-10.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis L, Raff M, Roberts K, Walter P, (4. Auflage): Molecular Biology of the Cell; Kapitel 2: Cell Chemistry and Biosynthesis, The Chemical Components of a Cell, Catalysis and the Use of Energy by Cells. *Taylor & Francis*.
3. Alberts B, Johnson A, Lewis L, Raff M, Roberts K, Walter P, (4. Auflage): Molecular Biology of the Cell; Kapitel 14: Energy Conversion: Mitochondria and Chloroplasts. *Taylor & Francis*.
4. Alberts B, Johnson A, Lewis L, Raff M, Roberts K, Walter P, (4. Auflage): Molecular Biology of the Cell; Kapitel 24: The Adaptive Immune System. *Taylor & Francis*.
5. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ, (1990): Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**:403-410.
6. Armstrong NJ, van de Wiel MA, (2004): Microarray data analysis: from hypotheses to conclusions using gene expression data. *Cell Oncol* **26**:279-290.
7. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL, (2007): GenBank. *Nucleic Acids Res* **35**:D21-25.
8. Binder BR, Mihaly J, Prager GW, (2007): uPAR-uPA-PAI-1 interactions and signaling: a vascular biologist's view. *Thromb Haemost* **97**:336-342.
9. Black MA, Doerge RW, (2002): Calculation of the minimum number of replicate spots required for detection of significant gene expression fold change in microarray experiments. *Bioinformatics* **18**:1609-1616.
10. Bland JM, Altman DG, (1986): Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* **1**:307-310.
11. Bosotti R, Locatelli G, Healy S, Scacheri E, Sartori L, Mercurio C, Calogero R, Isacchi A, (2007): Cross platform microarray analysis for robust identification of differentially expressed genes. *BMC Bioinformatics* **8 Suppl 1**:S5.
12. Camenisch G, Stroka DM, Gassmann M, Wenger RH, (2001): Attenuation of HIF-1 DNA-binding activity limits hypoxia-inducible endothelin-1 expression. *Pflugers Arch* **443**:240-249.
13. Churchill GA, (2002): Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat Genet* **32 Suppl**:490-495.
14. Clerici C, Matthay MA, (2000): Hypoxia regulates gene expression of alveolar epithelial transport proteins. *J Appl Physiol* **88**:1890-1896.
15. Cui X, Churchill GA, (2003): Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. *Genome Biol* **4**:210.

16. Cummins EP, Taylor CT, (2005): Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch* **450**:363-371.
17. Cunningham AC, Milne DS, Wilkes J, Dark JH, Tetley TD, Kirby JA, (1994): Constitutive expression of MHC and adhesion molecules by alveolar epithelial cells (type II pneumocytes) isolated from human lung and comparison with immunocytochemical findings. *J Cell Sci* **107 (Pt 2)**:443-449.
18. Dabney AR, Storey JD, (2007): A new approach to intensity-dependent normalization of two-channel microarrays. *Biostatistics* **8**:128-139.
19. Debbabi H, Ghosh S, Kamath AB, Alt J, Demello DE, Dunsmore S, Behar SM, (2005): Primary type II alveolar epithelial cells present microbial antigens to antigen-specific CD4+ T cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **289**:L274-279.
20. Dhiman N, Bonilla R, O'Kane DJ, Poland GA, (2001): Gene expression microarrays: a 21st century tool for directed vaccine design. *Vaccine* **20**:22-30.
21. Dorssers LC, van Agthoven T, Brinkman A, Veldscholte J, Smid M, Dechering KJ, (2005): Breast cancer oestrogen independence mediated by BCAR1 or BCAR3 genes is transmitted through mechanisms distinct from the oestrogen receptor signalling pathway or the epidermal growth factor receptor signalling pathway. *Breast Cancer Res* **7**:R82-92.
22. Draghici S, Khatri P, Tarca AL, Amin K, Done A, Voichita C, Georgescu C, Romero R, (2007): A systems biology approach for pathway level analysis. *Genome Res* **17**:1537-1545.
23. Dudoit S, Yang, Y. H., and Bolstad, B., (2002): Using R for the analysis of DNA microarray data. *R News* **2 (1)**:24-32.
24. Eickelberg O, Seeger W, (2005): Pulmonary hypertension: pathophysiology, genetics and functional genomics. *Internist (Berl)* **46**:759-768.
25. Fahy RJ, Lichtenberger F, McKeegan CB, Nuovo GJ, Marsh CB, Wewers MD, (2003): The acute respiratory distress syndrome: a role for transforming growth factor-beta 1. *Am J Respir Cell Mol Biol* **28**:499-503.
26. Faller DV, (1999): Endothelial cell responses to hypoxic stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**:74-84.
27. Favre CJ, Mancuso M, Maas K, McLean JW, Baluk P, McDonald DM, (2003): Expression of genes involved in vascular development and angiogenesis in endothelial cells of adult lung. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**:H1917-1938.
28. Fink L, Kohlhoff S, Stein MM, Hanze J, Weissmann N, Rose F, Akkayagil E, Manz D, Grimminger F, Seeger W, Bohle RM, (2002): cDNA array hybridization after laser-assisted microdissection from nonneoplastic tissue. *Am J Pathol* **160**:81-90.
29. Fink L, Seeger W, Ermert L, Hanze J, Stahl U, Grimminger F, Kummer W, Bohle RM, (1998): Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nat Med* **4**:1329-1333.

30. Fink L, Stahl U, Ermert L, Kummer W, Seeger W, Bohle RM, (1999): Rat porphobilinogen deaminase gene: a pseudogene-free internal standard for laser-assisted cell picking. *Biotechniques* **26**:510-516.
31. Frid MG, Brunetti JA, Burke DL, Carpenter TC, Davie NJ, Reeves JT, Roedersheimer MT, van Rooijen N, Stenmark KR, (2006): Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage. *Am J Pathol* **168**:659-669.
32. Hazzalin CA, Mahadevan LC, (2002): MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:30-40.
33. Hoheisel JD, (2006): Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis. *Nat Rev Genet* **7**:200-210.
34. Hyvelin JM, Howell K, Nichol A, Costello CM, Preston RJ, McLoughlin P, (2005): Inhibition of Rho-kinase attenuates hypoxia-induced angiogenesis in the pulmonary circulation. *Circ Res* **97**:185-191.
35. Jones PL, Chapados R, Baldwin HS, Raff GW, Vitvitsky EV, Spray TL, Gaynor JW, (2002): Altered hemodynamics controls matrix metalloproteinase activity and tenascin-C expression in neonatal pig lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **282**:L26-35.
36. Ke Q, Costa M, (2006): Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* **70**:1469-1480.
37. Kerr MK, Churchill GA, (2001): Experimental design for gene expression microarrays. *Biostatistics* **2**:183-201.
38. Kewley RJ, Whitelaw ML, Chapman-Smith A, (2004): The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol* **36**:189-204.
39. Khatri P, Voichita C, Kattan K, Ansari N, Khatri A, Georgescu C, Tarca AL, Draghici S, (2007): Onto-Tools: new additions and improvements in 2006. *Nucleic Acids Res* **35**:W206-211.
40. Klinghoffer RA, Sachsenmaier C, Cooper JA, Soriano P, (1999): Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *Embo J* **18**:2459-2471.
41. Knight J, (2001): When the chips are down. *Nature* **410**:860-861.
42. Kobs RW, Muvarak NE, Eickhoff JC, Chesler NC, (2005): Linked mechanical and biological aspects of remodeling in mouse pulmonary arteries with hypoxia-induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**:H1209-1217.
43. Kwapiszewska G, Wilhelm J, Wolff S, Laumanns I, Koenig IR, Ziegler A, Seeger W, Bohle RM, Weissmann N, Fink L, (2005): Expression profiling of laser-microdissected intrapulmonary arteries in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Respir Res* **6**:109.

44. Kyriakis JM, Avruch J, (2001): Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81**:807-869.
45. Lahiri S, Roy A, Baby SM, Hoshi T, Semenza GL, Prabhakar NR, (2006): Oxygen sensing in the body. *Prog Biophys Mol Biol* **91**:249-286.
46. Lanner MC, Raper M, Pratt WM, Rhoades RA, (2005): Heterotrimeric G proteins and the platelet-derived growth factor receptor-beta contribute to hypoxic proliferation of smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **33**:412-419.
47. Lee JW, Juliano R, (2004): Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways. *Mol Cells* **17**:188-202.
48. Lee SH, Rubin LJ, (2005): Current treatment strategies for pulmonary arterial hypertension. *J Intern Med* **258**:199-215.
49. Li D, Fernandez LG, Dodd-o J, Langer J, Wang D, Laubach VE, (2005): Upregulation of hypoxia-induced mitogenic factor in compensatory lung growth after pneumonectomy. *Am J Respir Cell Mol Biol* **32**:185-191.
50. Lippert H, (5. Auflage): Lehrbuch Anatomie; Kapitel 3.3.5: Lungenbläschen. *Urban & Fischer*.
51. Liu T, Dhanasekaran SM, Jin H, Hu B, Tomlins SA, Chinnaiyan AM, Phan SH, (2004): FIZZ1 stimulation of myofibroblast differentiation. *Am J Pathol* **164**:1315-1326.
52. Lo LW, Cheng JJ, Chiu JJ, Wung BS, Liu YC, Wang DL, (2001): Endothelial exposure to hypoxia induces Egr-1 expression involving PKC α -mediated Ras/Raf-1/ERK1/2 pathway. *J Cell Physiol* **188**:304-312.
53. Macchia A, Marchioli R, Marfisi R, Scarano M, Levantesi G, Tavazzi L, Tognoni G, (2007): A meta-analysis of trials of pulmonary hypertension: a clinical condition looking for drugs and research methodology. *Am Heart J* **153**:1037-1047.
54. Madjdpour C, Jewell UR, Kneller S, Ziegler U, Schwendener R, Booy C, Klausli L, Pasch T, Schimmer RC, Beck-Schimmer B, (2003): Decreased alveolar oxygen induces lung inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **284**:L360-367.
55. Mauban JR, Remillard CV, Yuan JX, (2005): Hypoxic pulmonary vasoconstriction: role of ion channels. *J Appl Physiol* **98**:415-420.
56. Midorikawa Y, Makuuchi M, Tang W, Aburatani H, (2007): Microarray-based analysis for hepatocellular carcinoma: from gene expression profiling to new challenges. *World J Gastroenterol* **13**:1487-1492.
57. Moudgil R, Michelakis ED, Archer SL, (2005): Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol* **98**:390-403.
58. Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Zhou XM, Foster D, Brugge JS, Sukhatme VP, (1995): Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation. *Nature* **375**:577-581.
59. NanoDrop-Technologies, (2007): ND-1000 Spectrophotometer V3.3 User's Manual.

60. Neefjes JJ, Momburg F, (1993): Cell biology of antigen presentation. *Curr Opin Immunol* **5**:27-34.
61. Oberringer M, Meins C, Bubel M, Pohlemann T, (2007): In vitro wounding: effects of hypoxia and transforming growth factor beta(1) on proliferation, migration and myofibroblastic differentiation in an endothelial cell-fibroblast co-culture model. *J Mol Histol* **Online First**.
62. Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M, (1999): KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* **27**:29-34.
63. Olschewski H, Seeger W, Grimminger F, (1999): Physiology and physiopathology of the pulmonary circulation. *Internist* **40**:696-709.
64. Perkowski S, Sun J, Singhal S, Santiago J, Leikauf GD, Albelda SM, (2003): Gene expression profiling of the early pulmonary response to hyperoxia in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* **28**:682-696.
65. Petersen D, Chandramouli GV, Geoghegan J, Hilburn J, Paarlberg J, Kim CH, Munroe D, Gangi L, Han J, Puri R, Staudt L, Weinstein J, Barrett JC, Green J, Kawasaki ES, (2005): Three microarray platforms: an analysis of their concordance in profiling gene expression. *BMC Genomics* **6**:63.
66. Pinet F, (2004): What is the role of endothelin system? *Med Sci* **20**:339-345.
67. Plomin R, Schalkwyk LC, (2007): Microarrays. *Dev Sci* **10**:19-23.
68. Prabhakar NR, (2006): O₂ sensing at the mammalian carotid body: why multiple O₂ sensors and multiple transmitters? *Exp Physiol* **91**:17-23.
69. Puri A, McGoon MD, Kushwaha SS, (2007): Pulmonary arterial hypertension: current therapeutic strategies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **4**:319-329.
70. Reddy KV, Mangale SS, (2003): Integrin receptors: the dynamic modulators of endometrial function. *Tissue Cell* **35**:260-273.
71. Riggins RB, Quilliam LA, Bouton AH, (2003): Synergistic promotion of c-Src activation and cell migration by Cas and AND-34/BCAR3. *J Biol Chem* **278**:28264-28273.
72. Rubin LJ, (1997): Primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* **336**:111-117.
73. Schena M, Heller RA, Thériault TP, Konrad K, Lachenmeier E, Davis RW, (1998): Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends Biotechnol* **16**:301-306.
74. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO, (1995): Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**:467-470.
75. Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F, (2005): Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* **115**:2811-2821.

76. Schulz R, Grebe M, Eisele HJ, Mayer K, Weissmann N, Seeger W, (2006): Obstructive sleep apnea-related cardiovascular disease. *Med Klin* **101**:321-327.
77. Semenza GL, (2000): Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease. *Respir Res* **1**:159-162.
78. Semenza GL, (2005): Pulmonary vascular responses to chronic hypoxia mediated by hypoxia-inducible factor 1. *Proc Am Thorac Soc* **2**:68-70.
79. Semenza GL, Agani F, Booth G, Forsythe J, Iyer N, Jiang BH, Leung S, Roe R, Wiener C, Yu A, (1997): Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. *Kidney Int* **51**:553-555.
80. Sgroi DC, Teng S, Robinson G, LeVangie R, Hudson JR, Jr., Elkahoul AG, (1999): In vivo gene expression profile analysis of human breast cancer progression. *Cancer Res* **59**:5656-5661.
81. Sid B, Sartelet H, Bellon G, El Btaouri H, Rath G, Delorme N, Haye B, Martiny L, (2004): Thrombospondin 1: a multifunctional protein implicated in the regulation of tumor growth. *Crit Rev Oncol Hematol* **49**:245-258.
82. Simonneau G, Galie N, Rubin LJ, Langleben D, Seeger W, Domenighetti G, Gibbs S, Lebrec D, Speich R, Beghetti M, Rich S, Fishman A, (2004): Clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* **43**:5S-12S.
83. Smith TF, Waterman MS, (1981): Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol* **147**:195-197.
84. Smyth GK, (2004): Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*. **3**.
85. Smyth GK, Michaud J, Scott HS, (2005): Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* **21**:2067-2075.
86. Smyth GK, Speed T, (2003): Normalization of cDNA microarray data. *Methods* **31**:265-273.
87. Smyth SS, Patterson C, (2002): Tiny dancers: the integrin-growth factor nexus in angiogenic signaling. *J Cell Biol* **158**:17-21.
88. Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG, (2006): Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ Res* **99**:675-691.
89. Stenmark KR, McMurtry IF, (2005): Vascular remodeling versus vasoconstriction in chronic hypoxic pulmonary hypertension: a time for reappraisal? *Circ Res* **97**:95-98.
90. Sun G, (2007): Application of DNA microarrays in the study of human obesity and type 2 diabetes. *Omics* **11**:25-40.
91. Taraseviciene-Stewart L, Nicolls MR, Kraskauskas D, Scerbavicius R, Burns N, Cool C, Wood K, Parr JE, Boackle SA, Voelkel NF, (2007): Absence of T cells confers increased pulmonary arterial hypertension and vascular remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* **175**:1280-1289.

92. Tchekneva E, Lawrence ML, Meyrick B, (2000): Cell-specific differences in ET-1 system in adjacent layers of main pulmonary artery. A new source of ET-1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **278**:L813-821.
93. Ten VS, Pinsky DJ, (2002): Endothelial response to hypoxia: physiologic adaptation and pathologic dysfunction. *Curr Opin Crit Care* **8**:242-250.
94. Teng X, Li D, Champion HC, Johns RA, (2003): FIZZ1/RELMalpha, a novel hypoxia-induced mitogenic factor in lung with vasoconstrictive and angiogenic properties. *Circ Res* **92**:1065-1067.
95. Terrien X, Bonvin E, Corroyer S, Tabary O, Clement A, Henrion Caude A, (2005): Intracellular colocalization and interaction of IGF-binding protein-2 with the cyclin-dependent kinase inhibitor p21CIP1/WAF1 during growth inhibition. *Biochem J* **392**:457-465.
96. Thobe BM, Frink M, Choudhry MA, Schwacha MG, Bland KI, Chaudry IH, (2006): Src family kinases regulate p38 MAPK-mediated IL-6 production in Kupffer cells following hypoxia. *Am J Physiol Cell Physiol* **291**:C476-482.
97. Tuchscherer HA, Vanderpool RR, Chesler NC, (2007): Pulmonary vascular remodeling in isolated mouse lungs: effects on pulsatile pressure-flow relationships. *J Biomech* **40**:993-1001.
98. Vairapandi M, Balliet AG, Hoffman B, Liebermann DA, (2002): GADD45b and GADD45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress. *J Cell Physiol* **192**:327-338.
99. van Agthoven T, van Agthoven TL, Dekker A, van der Spek PJ, Vreede L, Dorssers LC, (1998): Identification of BCAR3 by a random search for genes involved in antiestrogen resistance of human breast cancer cells. *Embo J* **17**:2799-2808.
100. Vervoort VS, Roselli S, Oshima RG, Pasquale EB, (2007): Splice variants and expression patterns of SHEP1, BCAR3 and NSP1, a gene family involved in integrin and receptor tyrosine kinase signaling. *Gene* **391**:161-170.
101. Voelkel NF, Douglas IS, Nicolls M, (2007): Angiogenesis in chronic lung disease. *Chest* **131**:874-879.
102. von der Hardt K, Kandler MA, Fink L, Schoof E, Dotsch J, Bohle RM, Rascher W, (2003): Laser-assisted microdissection and real-time PCR detect anti-inflammatory effect of perfluorocarbon. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**:L55-62.
103. Weissmann N, Grimminger F, Olschewski A, Seeger W, (2001): Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a multifactorial response? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**:L314-317.
104. Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, (2006): Hypoxia in lung vascular biology and disease. *Cardiovasc Res* **71**:618-619.
105. Weissmann N, Sommer N, Schermuly RT, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F, (2006): Oxygen sensors in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc Res* **71**:620-629.

106. Weissmann N, Zeller S, Schafer RU, Turowski C, Ay M, Quanz K, Ghofrani HA, Schermuly RT, Fink L, Seeger W, Grimminger F, (2006): Impact of mitochondria and NADPH oxidases on acute and sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol* **34**:505-513.
107. Wesselkamper SC, Case LM, Henning LN, Borchers MT, Tichelaar JW, Mason JM, Dragin N, Medvedovic M, Sartor MA, Tomlinson CR, Leikauf GD, (2005): Gene expression changes during the development of acute lung injury: role of transforming growth factor beta. *Am J Respir Crit Care Med* **172**:1399-1411.
108. Whitmarsh AJ, (2007): Regulation of gene transcription by mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* **1773**:1285-1298.
109. Wilhelm J, Muyal JP, Best J, Kwapiszewska G, Stein MM, Seeger W, Bohle RM, Fink L, (2006): Systematic comparison of the T7-IVT and SMART-based RNA preamplification techniques for DNA microarray experiments. *Clin Chem* **52**:1161-1167.
110. Wilhelm J, Pingoud A, (2003): Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem* **4**:1120-1128.
111. Yamaji-Kegan K, Su Q, Angelini DJ, Champion HC, Johns RA, (2006): Hypoxia-induced mitogenic factor has proangiogenic and proinflammatory effects in the lung via VEGF and VEGF receptor-2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **291**:L1159-1168.
112. Yan SF, Tritto I, Pinsky D, Liao H, Huang J, Fuller G, Brett J, May L, Stern D, (1995): Induction of interleukin 6 (IL-6) by hypoxia in vascular cells. Central role of the binding site for nuclear factor-IL-6. *J Biol Chem* **270**:11463-11471.
113. Yang YH, Speed T, (2002): Design issues for cDNA microarray experiments. *Nat Rev Genet* **3**:579-588.
114. Yogi A, Callera GE, Montezano AC, Aranha AB, Tostes RC, Schiffrin EL, Touyz RM, (2007): Endothelin-1, but not Ang II, activates MAP kinases through c-Src independent Ras-Raf dependent pathways in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**:1960-1967.

9 Verzeichnis wissenschaftlicher Publikationen

Publikationen

1. Wilhelm J, Muyal JP, Best J, Kwapiszewska G, Stein MM, Seeger W, Bohle RM, Fink L, (2006): Systematic comparison of the T7-IVT and SMART-based RNA preamplification techniques for DNA microarray experiments. *Clin Chem* **52**:1161-1167.
2. Kwapiszewska G, Chwalek J, Wilhelm J, Best J, Marsh L, Seeger W, Weissmann N, Eickelberg O, Fink L, (2008): Trk beta receptor and its ligand BDNF, important factors in hypoxic vascular remodelling and IPAH. - in Präparation -

Poster und Abstracts

1. Kwapiszewska G, Wilhelm J, Best J, Schmitt S, Linder M, Königshoff M, Seeger W, Bohle RM, Weissmann N, Fink L: Bestimmung Hypoxie-induzierter Expressionsprofile auf Transkriptom- und Proteomebene. *DG für Pneumologie*, (16.-19. März 2005), Berlin
2. Kwapiszewska G, Wilhelm J, Best J, Wolff J, Schmitt S, Linder M, Weissmann N, Seeger W, Bohle RM, Fink L: Hypoxie-induzierte Expressions-Regulationen auf Transkriptom- und Proteomebene in der Lunge. *DG für Innere Medizin*, (02.-06. April 2005), Wiesbaden
3. Wilhelm J, Best J, Kwapiszewska G, Seeger W, Weissmann N, Fink L, Bohle RM: Differenzielle Genexpression nach kurzer Hypoxie. *DG für Pathologie*, (18.-21. Mai 2005), Wuppertal
4. Wilhelm J, Best J, Kwapiszewska G, Seeger W, Weissmann N, Fink L, Bohle RM, (2005): Differentially expressed genes under early hypoxia in the lung. *Am J Respir Crit Care Med* **171**, 7:A731.
5. Kwapiszewska G, Chwalek J, Wilhelm J, Best J, Marsh L, Seeger W, Weissmann N, Eickelberg O, Fink L: Trk beta receptor and its ligand BDNF, important factors in hypoxic vascular remodelling and IPAH. *5th European Respiratory Society*, (23.-25. März 2007), Taormina

10 Anhang

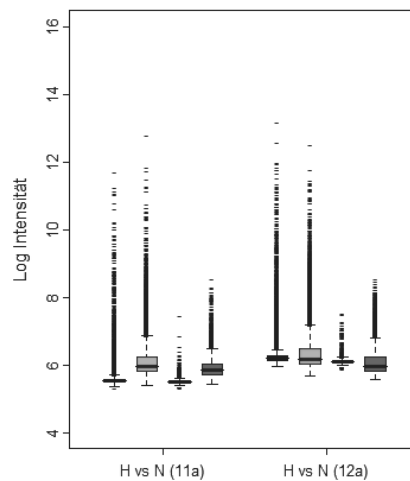


Abb. 10.1 Fluoreszenzintensitäten von Microarrays einer defekten Charge

Gezeigt sind die logarithmisch dargestellten Fluoreszenzintensitäten einer defekten Microarray Charge. Jedem einzelnen Array (H vs. N = Hypoxie vs. Normoxie; Nummer 11a und 12a) sind vier Spalten zugeordnet, wobei die ersten beiden die Intensitäten der Spots und die letzten beiden die Hintergrundintensitäten für die Wellenlängen 635nm (rot) bzw. 535nm (grün) zeigen. Der Median der Fluoreszenzintensität ist durch die horizontale Linie gezeigt, die sich innerhalb des jeweiligen Interquartils (dunkelgraue oder hellgraue Box) befindet. Die Höhe der Box entspricht dem Interquartilsabstand, in dem 50% aller Werte liegen. Die Länge der Whisker (gestrichelte Vertikale ober- und unterhalb der Box) wird durch den 1.5-fachen Interquartilsabstand festgelegt. Werte ober- und unterhalb der Whisker sind als Einzelwerte durch kurze horizontale Striche gezeigt.

11 Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, Juli 2009

Johannes Best

12 Danksagung

Die vorliegende Dissertation wäre nicht zustande gekommen, wenn ich nicht breite Unterstützung und Hilfe gehabt hätte.

Besonders danken möchte ich Prof. Dr. Ludger Fink für die langjährige Betreuung meiner Promotion und für die interessante Aufgabenstellung meiner wissenschaftlichen Arbeit, welche ich im Rahmen des SFB 547 am Institut für Pathologie durchführen durfte. Danken möchte ich weiterhin Dr. Jochen Wilhelm für seine Mithilfe bei der Etablierung der Microarray-Technologie, der statistischen Auswertung der Daten sowie unzähligen Tipps und Anregungen in Bezug auf die Experimente und das spätere Schreiben der Dissertation. Mein besonderer Dank gilt Marlene Stein für eine wunderbare Einarbeitung in die Geheimnisse des Labors und im Verlauf für das geduldige Ertragen von so mancher kniffligen Situation, wobei sie stets mit guten Ratschlägen zur Seite stand. Ebenso immer ansprechbar bei Fragen rund um das Laborgeschehen und immer hilfsbereit war Esther Kuhlmann. Jens Wolff möchte ich für das kritische Lesen meiner Dissertation und die nützlichen Anregungen danken; seiner Frau Stephanie, dass sie ihm die Zeit hierzu freigehalten hat. Ohne die stetige Unterstützung von Grazyna Kwapiszewska wäre die Zeit im Labor sicherlich wesentlich schwieriger gewesen. Danke dir für die Einweisung in die molekularbiologische Welt und für ein stets offenes Ohr bei sämtlichen Fragen und Problemen. Danke Zeevi Israeli für deine interessanten Ansatzpunkte beim Schreiben der Diskussion. Danken möchte ich weiterhin Jai Prakash Moyal, mit dem ich lange an der Optimierung der Microarrays gearbeitet habe.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für die finanzielle Unterstützung in den letzten Jahren und vor allem auch für die zahllosen Durchhalteparolen. Meiner Schwester Ann-Kathrin möchte ich vor allem dafür danken, mein Klagen am Telefon zu ertragen und die Geduld, meine Arbeit im Vorfeld ausführlich zu lesen und Verbesserungsvorschläge zu machen.

Zuletzt möchte ich dem Menschen in meinem Leben danken, der mir die nötige Kraft gegeben hat, diese Arbeit zu Ende zu bringen. Danke Antje für die unendliche Geduld.

Ebenso sei allen denen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5570-5



9 783835 195570